UNIVERSITE SCIENTIFIQUE
ET MEDICALE DE GRENOBLE

Université d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Année 1972

N° d'ordre : 6

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES GRAINES DE CASSIA ABSUS L. CAESALPINIEES

(Plante d'origine africaine)

THESE
présentée

à l'Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
pour obtenir le titre de
DOCTEUR D'UNIVERSITÉ EN PHARMACIE

par

Georges TRAJMAN

Soutenue publiquement le 18 Décembre 1972 devant la commission d'examen :

Président : Mme A.M. DEBELMAS
Assesseurs : M. A. COEUR
M. G. NETIEN
Mme A. VERAIN

Membre invité : M.M. FAURE Industriel, Docteur en Pharmacie.

UNIVERSITE SCIENTIFIQUE
ET MEDICALE DE GRENOBLE

Université d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Année 1972 N° d'ordre : 6

CONTRIBUTION
A L'ETUDE DES GRAINES DE
CASSIA ABSUS L. CAESALPINIEES

(Etude d'origine africaine)

THESE
présentée

à l'Université d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
pour obtenir le titre de
DOCTEUR D'UNIVERSITE EN PHARMACIE

par

Georges TRAJMAN

Soutenue publiquement le 18 Décembre 1972 devant la commission d'examen :

Président : Mme A.M. DEBELMAS
Assesseurs : M. A. COEUR
M. G. NETIEN
Mme A. VERAIN

Membre invité : M.M. FAURE Industriel, Docteur en Pharmacie.

UNIVERSITE SCIENTIFIQUE
ET MEDICALE DE GRENOBLE

Université d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Année 1972

N° d'ordre : 6

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES GRAINES DE CASSIA ABSUS L. CAESALPINIEES

(Plante d'origine africaine)

THESE
présentée

à l'Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
pour obtenir le titre de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ EN PHARMACIE

par

Georges TRAJMAN

Soutenue publiquement le 18 Décembre 1972 devant la commission d'examen :

Président : Mme A.M. DEBELMAS
Assesseurs : M. A. COEUR
M. G. NETIEN
Mme A. VERAIN

Membre invité : M.M. FAURE Industriel, Docteur en Pharmacie.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A la mémoire de mes parents,

A Lydie et Natacha,
avec tout mon amour.

A Madame le Professeur Anne-Marie DEBELMAS,

Professeur de Matière Médicale à l'UER des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Grenoble.

Nous avons trouvé en elle notre meilleur guide, son enseignement et ses conseils nous restent toujours à l'esprit. En nous suivant amicalement dans nos travaux, elle nous a donné le goût de la rigueur scientifique et nous avons toujours trouvé auprès d'elle l'appui moral qui nous était nécessaire.

Qu'elle trouve ici, l'expression de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur André COEUR,

Professeur de Chimie Analytique et Pharmacie Chimique à l'UER des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Grenoble.

Son enseignement et ses conseils ne nous ont jamais fait défaut tout au long de nos études. Il nous fait aujourd'hui l'honneur de juger ce travail.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueux souvenir.

A Monsieur le Professeur Georges NETIEN,

Professeur de Botanique et de Biologie Cellulaire à l'UER des Science Pharmaceutiques de Lyon.

Nous lui adressons nos sincères remerciements pour avoir bien voulu nous honorer de sa présence.

A Madame le Professeur Alice VERAIN,

Professeur de Pharmacie Galénique à l'UER des Sciences Pharmaceutique et Biologiques de Grenoble.

Sa profonde gentillesse et ses précieux conseils nous ont été d'un grand secours. Une partie de ce travail a été réalisée dans son Laboratoire et avec son aide constante.

Nous l'en remercions bien vivement.

A Monsieur Michel FAURE,

Docteur en Pharmacie,
Directeur Scientifique des Laboratoires H. FAURE.

Sans lui, ce travail n'aurait pas été possible. Son soutien matériel et moral nous a profondément touché.

Qu'il veuille bien trouver ici, ainsi que Monsieur Henri FAURE, Président Directeur Général des Laboratoires H. FAURE, l'expression de notre profonde gratitude.

Nous ne saurions oublier ici, tous ceux dont la collaboration nous a été bénéfique.

Nous pensons plus particulièrement à

Mademoiselle le Professeur J. ALARY,
Monsieur le Professeur CHAMBAZ,
Monsieur le Professeur JALBERT,
Monsieur le Professeur J. LATURAZE,
Monsieur le Professeur MAGNIN,
Madame DEFAYE,
Monsieur C. JEANNIN,
Monsieur J. ROCHAT,
Mademoiselle A.M. VERNEY.

Nous remercions également tout le personnel des Laboratoires de Matière Médicale et de Pharmacie Galénique.

I N T R O D U C T I O N

CASSIA ABSUS L. est une plante annuelle herbacée pouvant atteindre 1 m. à 1 m 50 de hauteur, localisée comme beaucoup de Caesalpiniées dans les régions tropicales et subtropicales du globe.
Son habitat connu s'étend de l'Afrique aux Indes en passant par le Proche-Orient.
Au Sénégal, elle est signalée en Basse Casamance, et dans le Boundou (1).
Elle se rencontre sporadiquement en Côte d'Ivoire dans les régions de Bingerville, les savanes lagunaires, le pays Lobi, Abengourou, Bondoukou (2).
Elle pousse également dans de nombreux pays d'Afrique équatoriale : Sierra Leone, Ghana, Nigéria (3) aussi bien qu'en Iran (4) où elle est abondante ainsi qu'en Inde (5) et au Pakistan.
Les échantillons que nous avons étudiés ont été récoltés au Sénégal et en Côte d'Ivoire.

Les guérisseurs de ces différentes contrées l'utilisent dans les mêmes buts sinon sous la même forme :

a) - Les feuilles et les fruits contenant leurs graines en emplâtres contre blessures et abcès, ainsi que pour cicatriser les chancres syphilitiques (6).

(1) KERHARO (J.) Bull. Soc. Med. Afr. Noire Lgue Fr. 1969, XIV, (1), 1-19.
(2) KERHARO (J.) et BOUQUET (A.) Plantes Médicinales et toxiques de la Côte d'Ivoire, Haute Volta, Paris, Vigot Fr., 1950, 103.
(3) CAIMENT LE BLOND (J.) Thèse Fac. Pharm. Paris, 1957, 39.
(4) ETESSAMI (S.) Thèse Fac. Pharm. Paris, 1949, 53-54.
(5) DYMOCK (W.) Veg. Matéria Medica West India. Bombay, 1885, 267.
(6) KERHARO (J.) Pl. Med. et Phytothérapie. 1968, 2, (2), 108-146.

b) - Les graines concassées et broyées sont également employées sur les blessures et ulcérations (1), ou bien, finement tamisées, dans certaines maladies oculaires.

La médecine traditionnelle, nous le voyons, fait appel à cette plante de façon convergente dans de nombreux pays, et il nous a paru particulièrement intéressant d'apporter de nouveaux éléments à la connaissance de sa composition chimique.

Noms vernaculaires

a) SENEGAL (2)

Dialecte		Nom
- Wolof	:	Kordio
- Serer	:	Kordiotev
- Peul	:	Korodiel
- Bambara	:	Karibono

b) IRAN (3)

Tchachu

c) INDE (4)

- Hindoustani	:	Chaksu.

(1) DE WILDEMAN (E.) Médicament antilépreux d'origine végétale. Inst. Royal col. Belge, t.X., Bruxelles 1948.

(2) KERHARO (J.) Bull. Soc. Med. Afr. Noire, Lgue Fr. 1969, XIV, (1), 1-

(3) ETESSAMI (S.), Thès. Fac. Pharm. Paris, 1949, 53-54.

(4) NADKARNI (A.K.) Indian Materia Medica. Bombay, 1954, 282.

- RAPPEL BOTANIQUE -

I - Généralités sur les Cassia

II - Cassia Absus L. - Caractères particuliers

1 - Description et étude morphologique

2 - Description de la graine.

- RAPPEL BOTANIQUE -

I - Généralités sur les Cassia.-

Le genre Cassia créé par LINNE (1) appartient à la famille des Légumineuses, sous famille des Caesalpiniées.

Les quelques 800 espèces du genre Cassia forment elles-mêmes une tribu : les Cassiées, dont une révision a été proposée à la fin du siècle dernie par BENTHAM (2), et reprise par ENGLER (3).

Elle est résumée dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU I

CLASSIFICATION DE BENTHAM.-

SOUS GENRE	SECTION
I - FISTULA	1) Fistula
II - SENNA	2) Chamaefistula 3) Oncolobium 4) Prososperma 5) Chamaesenna 6) Psilorhegma
III - LASIORHEGMA	7) Apouconita 8) Absus 9) Chamaechrista

(1) LINNE (C.) Genera Plantarum, Stockholm, 1735.

(2) BENTHAM (G.) Transactions of the Linnean Society, London, 1871, 27, 503-591.

(3) ENGLER (A.) und PRANTL (K.) Die naturlichen Pflanzen Familien, Leipzi 1894, III, (3), 157.

II - Cassia Absus L. - Caractères particuliers.-

LINNE (1), dans Species Plantarum, le décrit comme un petit arbuste vivant en Inde et en Egypte.

AUBLET (2), dans son Histoire des Plantes de la Guyane Française, reprend pratiquement cette description de même que VOGEL (3), dans son ouvrage sur les Cassia.

1) - Description et étude morphologique :

Les feuilles sont paripennées et on note l'absence de foliole terminale. Les deux paires de folioles sont ovales, dissymétriques, pubescentes sur les deux faces et comportent 4 à 5 nervures.
Les fleurs sont jaunes à revers rougeâtre et ont 5 pétales et 10 étamines fertiles.
Les gousses sont plates, dressées, longues de 4 à 5 cm, larges de 7 mm. Elles contiennent de 7 à 8 graines.
La plante petite (1 m à 1m 50) est velue et l'on distingue nettement les poils sur les surfaces des tiges (voir figure 1).

Cette morphologie correspond bien aux descriptions citées précédemment et à celle plus récente de J. BERHAUT (4).

Les caractères décrits correspondent bien à ceux de l'échantillon déposé à l'herbier du Laboratoire de Matière Médicale de Grenoble, récolté au Sénégal (n° 535).

(1) LINNE (C.) Species Plantarum, Stockholm, 1753, 376.
(2) AUBLET (E.) Histoire des Plantes de la Guyane Française, Paris, 1775, 1, 381.
(3) VOGEL (Th.) Generis Cassiae Synopsis, Berlin, 1837, 50.
(4) BERHAUT (J.) Flore du Sénégal, Dakar, 1967, 51.

2) - Description de la graine : (observations personnelles)

Noire, elle mesure environ 5 mm ; son aspect est lisse et brillant. Une extrémité est arrondie (3 à 4 mm de largeur) et une extrémité en pointe (hile).

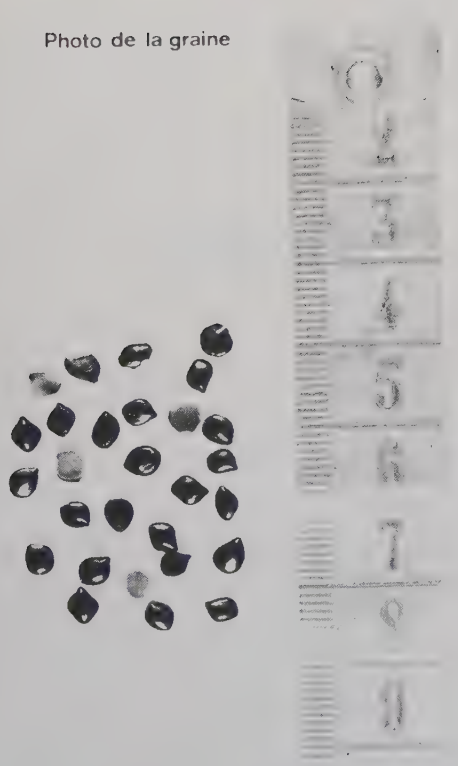
Au broyage, on sépare à la périphérie, une lentille de téguments accompagnés de tissus formant une pellicule translucide élastique, et au centre une amande jaunâtre.

Les cellules à mucilage souvent présentes chez les Caesalpiniées sont ici mises en évidence dans les graines par la coloration au rouge de ruthénium.

Figure 1. Description de la plante - D'après J. BERHAUT.-

Photo de la plante (échelle 1/4)

Photo de la graine



- ETUDE CHIMIQUE -

-=-=-=-=-=-=-=-

TRAVAUX ANTERIEURS

I. Les Cassia

II. C. absus

TRAVAUX PERSONNELS

I. Composition générale. Essais préliminaires

II. Etude de quelques fractions

A) Protéines

B) Polysaccharides

C) Polyphénols

D) Substance X

E) Insaponifiable

CONCLUSIONS

- ETUDE CHIMIQUE -

TRAVAUX ANTERIEURS

I. Les Cassia.-

L'étude chimique d'abord limitée à un petit nombre d'espèces sur les 800 existantes, s'est développée avec l'arrivée de techniques nouvelles principalement avec la chromatographie en couches minces.

Ces recherches ont surtout porté sur l'identification de dérivés anthracéniques dans des Cassia réputés purgatifs, les sénés en particulier.

Les premiers hétérosides isolés par STOLL (1) à partir des folioles de Cassia angustifolia sont les sennosides A et B. Puis de nombreux hétérosides ont été caractérisés dans d'autres espèces : rhéine monoglucoside de Cassia acutifolia (2) par exemple.

Les travaux de FAIRBAIRN (3) puis de R. ANTON et P. DUQUENOIS (4) ont permis de dresser "l'identité anthracénique" de plusieurs espèces.

(1) STOLL (A.), BECKER (B.) et KUSSMAUL (W.) Helv. Chim. Acta, 1949, 32, 1892-93.

(2) MAURIN (E.) Bull. Sc. Pharmacol. 1922, 29, 617-622.

(3) FAIRBAIRN (J.W.), FRIEDMANN (C.A.) et RYAN (M.A.) J. Pharm. Pharmac 1958, 10, 186-191.

(4) ANTON (R.) et DUQUENOIS (P.) Ann. Pharm. Fr. 1967, 10, 589-99.

Mais outre les dérivés anthracéniques, d'autres substances intéressantes de Cassia ont été étudiées :
polyphénols (1) (2), stérols (3)(4), tanins (5), mucilages (6), plus rarement des protéines (7), et cinq espèces, dont Cassia absus, sont citées comme possédant des alcaloïdes (5, 8, 10).

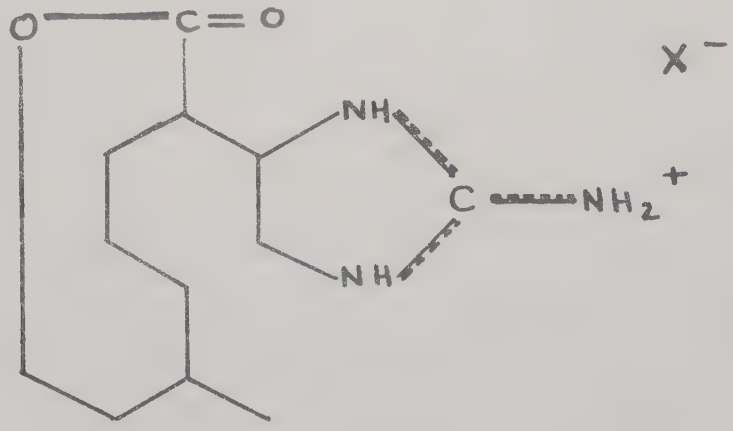
II. Cassia Absus L.

Les recherches ont porté sur la graine et ont abouti à l'isolement de plusieurs constituants :
En 1906, KOBERT (9) signale la présence d'une toxalbumine l'absine qui serait comparable à l'abrine d'Abrus praecatorius.
En 1936, AHMAD (10) étudie la partie lipidique de ces graines et donne la composition centésimale de l'huile extraite :
acides oléique 16,32 ; linoléïque 47,32 ; linolénique 0,41 ; hydroxyacides 0,75 ; acides palmitique 6,28 ; stéarique 8,10 ; lignocérique 0,82 ; insaponifiable 8,40 ; glycérol 10,40.

(1) TUTIN (F.) J. Chem. Soc. 1913, 103, 2006-23.
(2) ANTON (R.), DUQUENOIS (P.) C.R. Acad. Sc. Paris, 1968, 266, (14), 1523-5.
(3) CHAKRAVARTI (R.N.) and all. J. Sci. Indust. Res. 1956, 150, 86-8.
(4) SHUKLE (Y.N.) J. Ind. Chem. Soc. 1968, 45, (8), 744.
(5) CUBUKCU (B.) Th. Doct. Pharm. Paris, 1962.
(6) JOSHI (J.B.), VARMA (K.C.) Indian J. Pharm. 1964, 26, 175-7.
(7) PANT (R.), SINGH (K.) Naturwissenchaften, 1969, 56, 139.
(8) LYTH GOE (D.), VERNENGO (M.J.) Tetrahedron Letters 1967, 12, 1133-7.
(9) KOBERT (R.) Lehrbuch der Intoxicationem, Stuttgart, 1906, 707.
(10) AHMAD (Z.) Z. Undersuch Lebensm. 1936, 70, 166-9.

De l'insaponifiable JOHNSON (1) a plus récemment isolé en 1958 du β-sitostérol avec un rendement de 1,5 % et en 1964 QURESHI et ses collaborateurs ont mis en évidence du sitostérol β-D glucoside (2).

SIDDIQI et AHMAD (3) isolèrent en 1935 deux alcaloïdes, la chaksine et l'isochaksine, d'autant plus remarquables que cette classe de constituants est rare dans cette tribu. Les formules ont fait l'objet de nombreuses controverses (4), (5), (6).
Celle qui a été finalement adoptée pour la chaksine $C_{11}H_{19}O_2N_3$ montre une structure monoterpénique à cycle lactonique et un groupement guanidine (7 à 11), représentée comme suit :



(1) JOHNSON (A.W.) J. Org. Chem. 1958, 23, 1814-5.

(2) QURESHI (A.W.), AHSAN (A.M.), HAHN (G.) Pakist. J. Sci. Indust. Res. 1964, 7, (3), 219-20.

(3) SIDDIQI (S.), AHMAD (Z.) Proc. Indian Acad. Sci. 1935, 2A, 421-5.

(4) KAPUR (H.R.), GAIND (K.N.), NARANG (K.S.), RAY (J.N.) J. Ind. Chem. Soc. 1940, 17, 281-4.

(5) PURI (V.N.), SHARMA (V.N.), SIDDIQI (S.) Indian J. Sci. Indust. Res. 1964, 4, 701-4.

(6) AGRAWAL (S.R.), CHATAK (S.N.), DHINGRA (D.R.) Soap Journ. 1959, 25, 145-8.

(7) WIESNER (K.), VALENTA (Z.) J. Amer. Chem. Soc. 1958, 80, 1521-2.

(8) SING (G.), NAIR (G.V.), AGGARWAL (K.P.), SAKSENA (S.S.) Indian J. Sc Indust. Res. 1958, 17B, 322-3.

(9) KERMAL (A.), HAHN (G.), J. Chem. Soc. 1958, 555.

(10) MANSKE (R.H.F.) The alkaloïds, Academic Press N.Y., 1961.

(11) FOWLER (L.R.), VALENTA (Z.) and WIESNER (K.) Chem. and Indust. 1962, 1, 95.

Des études pharmacologiques (1 à 6) ont d'ailleurs été faites à leur sujet et ont montré que la chaksine était douée de propriétés anesthésiques locales, hypotensives, ganglioplégiques, stimulantes sur le muscle lisse et antistaphylococciques. L'isochaksine, un peu moins active possède cependant les mêmes propriétés (7).

Cependant, il nous faut noter que les recherches ont porté essentiellement sur la variété indienne.

Le laboratoire ayant pu disposer d'assez grandes quantités de graines récoltées au Sénégal, il nous a paru intéressant d'apporter notre contribution à l'étude chimique de la variété africaine non encore étudiée à ce jour, de vérifier l'existence des composés connus et si possible, d'en compléter l'inventaire.

(1) HAQUE (M.) Pharmacology of chaksine, Thesis, Pandjab University, Lahor 1945.

(2) CHOPRA (R.N.) Indigenous Drugs of India, Bombay, 1958.

(3) GUHA (S.R.) Science and Culture, 1958, 24, 146.

(4) NICKELL (L.G.) J. econom. Botany, 1959, 13, 281.

(5) KHAN (I.), BUKHARI (A.Q.S.), KHAN (M.H.) Pakist. J. Sci. Indust. Res. 1963, 6, 97.

(6) QAYUM (A.) Pakist. J. Sci. Indust. Res. 1970, 12, (4), 378-82.

(7) CHEEMA (M.A.) Intern. Arch. Pharmacodynamy 1965, 158, (2), 307-13.

TABLEAU II

	Anthracénosides	Polyphénols	Mucilages Gommes	Tanins	Alcaloïdes	Protéines	Stérols
C. fistula L.	+	+	+	+			
C. moschata H.B.	+			+			
C. sieberiana D.C.	+	+	+	+			
C. corymbosa Lam.		+					
C. occidentalis	+	+		+		+	+
C. sophera L.	+	+	+				+
C. marylandica L.	+	+			+		
C. tora L.		+		+		+	
C. siamea Lam.	traces	+			+		
C. alata L.	+	+	+	+		+	+
C. obovata Coll.	+	+		+			
C. acutifolia Del.	+	+					+
C. angustifolia Wahl	+	+					+
C. punctata Vog.		+					
C. goratensis Fres.	+	+		+			
C. carnaval					+		
C. absus L.		+	+		+	+	+
C. excelsa					+		

Dans le tableau ci-dessus, nous avons réuni des indications sur les co
posés connus de quelques Cassia d'après ANTON (1) et CUBUKCU (2).

(1) ANTON (R.) Thès. Doct. Pharm. Strasbourg, 1967.
(2) CUBUKCU (B.) Thès. Doct. Pharm. Paris, 1962.

TRAVAUX PERSONNELS

I. Composition générale - Essais préliminaires.-

Les essais préliminaires ont été faits sur des échantillons de graines grossièrement broyées au mixer.

- Humidité :

  Elle est mesurée sur 2 échantillons de 15 g chacun, à la balance CENCO à Infra-rouge.

  L'humidité moyenne est de 6 %.

- Cendres sulfuriques :

  Effectuées selon les recommandations des Pharmacopées française (1) et européenne (2).

  La moyenne pour deux échantillons est de 3,5 %.

- Recherche des quinones :

  a) 2 cm3 de teinture au 1/10è dans l'alcool à 80° sont évaporés à sec. Le résidu est repris par de l'eau bouillante et additionné de lessive de soude : Il n'apparaît pas de coloration rose ou rouge.

  b) 2 g de poudre de graines sont imbibés d'acide chlorhydrique N et extraits par 10 cm3 de chloroforme. Le solvant organique (coloré en jaune) est additionné de lessive de soude en veillant à ne pas mélanger les phases. On observe la formation d'un anneau jaune à la séparation des liquides, en même temps que la teinte jaune du chloroforme s'intensifie.

(1) Pharmacopée française 8è Ed. Paris, 1965, 1537.
(2) Pharmacopée européenne - Ed. Maisonneuve S.A. 1969, I, 3.

Cette réaction est en faveur de la présence de polyphénols du type flavone ou xanthone. Mais les quinones ou anthraquinones sont absentes.
Nous avons voulu confirmer ce dernier point en effectuant la réaction de la Pharmacopée française pour l'essai des sénés, réaction qui s'est révélée négative. De même un essai de chromatographie circulaire pour la détermination des anthraquinones libres n'a donné aucun résultat. Cela ne nous a d'ailleurs pas étonné , la plante n'ayant jamais été utilisée comme purgatif.

- Recherche des flavonoïdes :
Cet essai a été effectué sur un lixiviat à 5 % dans l'alcool à 80^{c}, à l'aide de la réaction de la cyanidine : 1 cm3 de lixiviat est additionné de 1 cm3 d'HCl concentré et d'un fragment de tournure de magnésium. On obtient très rapidement une réaction fortement positive se traduisant par une coloration rouge orangée intense.
Si à 1 cm3 de lixiviat dilué au demi avec de l'alcool à 96^{c}, on ajoute 1 cm3 de solution alcoolique de trichlorure d'aluminium à 5 % il se produit une fluorescence jaune à la lumière de Wood.

Ces résultats sont caractéristiques des flavones mais peuvent être donnés par certaines xanthones.

- Recherche des saponosides :
Par l'indice de mousse suivant la méthode de la Pharmacopée française L'indice trouvé est inférieur à 100. La graine ne contient donc pas de saponosides.

- Recherche des tanins :

Sur un infusé à 10 % par les deux réactions suivantes :

a) à 5 cm3 d'infusé on ajoute quelques gouttes de $Fe\ Cl_3$: absence de coloration.

b) 5 cm3 d'infusé et 5 cm3 de réactif de Stiasny (*) sont chauffés au bain-marie bouillant 30 minutes : Il n'y a pas de précipitation.

Ces deux réactions négatives permettent de conclure à l'absence de tanins.

- Recherche des alcaloïdes :

a) - sur la teinture au 1/10è dans l'alcool à 80°.

b) - sur un infusé à 10 %.

L'action des réactifs généraux des alcaloïdes en présence d'acide chlorhydrique dilué a donné les résultats suivants :

. Réactif de Draggendorf : précipité abondant orangé
. Réactif de Mayer : précipité blanc
. Réactif de Bouchardat : précipité brun foncé.

Ces réactions sont en faveur de la présence d'alcaloïdes déjà signalés dans la variété indienne.

- Recherche des polysaccharides :

Sur un volume de décocté dilué et filtré, on ajoute deux volumes d'éthanol : on obtient un précipité.

(*) Réactif de Stiasny (tanins catéchiques) : Formol à 30 % : 100 cm3
HCl concentré : 50 cm3

TABLEAU III

Humidité	6 %
Cendres sulfuriques	3,5 %
Quinones	-
Anthraquinones	-
Polyphénols	+ +
Saponosides	-
Tanins	-
Alcaloïdes	+ +
Polysaccharides	+ +

Le tableau ci-dessus récapitule ces essais.

Quelques-unes de ces réactions ont également été réalisées sur des extraits obtenus au Soxhlet par solvants successifs afin de prévoir les solubilités des différents constituants qu'il nous faudra étudier.

L'extraction au Soxhlet se fait sur 250 g de poudre de graines à l'aide de solvants de polarité croissante : hexane, chloroforme, éther éthylique, acétate d'éthyle, alcool à 96°, alcool à 30°, eau. On poursuit l'extraction en renouvelant les solvants jusqu'à épuisement complet de la poudre, vérifié par l'absence de résidu sec dans l'extractat. A chaque changement de solvant le marc est ventilé. Chaque extrait est concentré sous vide jusqu'à consistance d'extrait sec et pesé.
Les rendements et les réactions sont regroupés dans le tableau suivant :

TABLEAU IV

	Quinones	Stéroïdes	Caroténoïdes	Polyphénols	Alcaloïdes	Rendement en %
Hexane	-	+ +	+ +	-	-	3
Chloroforme	-	+ +	+ +	-	-	3
Ether éthylique	-	+	+	+	-	1,3
Acétate d'éthyle	-	+	+	+	-	1
Acétone	-	-	-	+	-	1,4
Alcool à 96°	-	-	-	+ +	+	2,4
Alcool à 30°	-	-	-	+ +	+	4
Eau	-	-	-	+	+	27

Conclusions :

Les fractions hexaniques et chloroformiques seront intéressantes par leurs stéroïdes et caroténoïdes.

Les fractions éther , acétate d'éthyle et acétone pourront nous livrer une partie des polyphénols qu'il faudra purifier des restes stéroïdes et caroténoïdes.

Les alcaloïdes qui ne passent que dans les extraits très polaires seront à séparer des polyphénols.

II. Etude particulière de quelques fractions.-

Dès le début de notre étude, nous avons noté des difficultés mécaniques qui ont orienté la première partie de nos travaux.(1)
Difficultés au broyage, formation d'une mousse jaune abondante et gonflement important de la masse, rendant irréalisables les extractions aqueuses, qui constituent pourtant la forme d'utilisation en médecine populaire.

Au cours du broyage, la graine se clive en deux sortes de fragments :
- L'amande jaune se concassant assez finement,
- Les tissus superficiels, élastiques, adhérant aux téguments brunâtres et ayant la forme de petites lentilles.

Si l'on sépare intégralement les deux parties de la graine, l'amande jaune, extraite alors par l'eau, provoque une mousse abondante, et les lentilles translucides forment une solution visqueuse.

Ceci nous a amené à étudier tout d'abord la fraction protéique de la partie interne et la fraction polysaccharidique de la partie externe.

(1) DEBELMAS (A.M.), FAURE (M.) et TRAJMAN (G.), Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon, 1969, 13, (4), 115-18.

A) - PROTEINES.-

Sur les "amandes", nous avons procédé à une extraction de type protéique dans le but de confirmer la présence de la toxalbumine signalée dans la littérature (1).
Elle semble d'après ses propriétés faire partie des phytotoxines telles que l'abrine (2) d'Abrus praecatorius (Jequirity), la ricine (3) de Ricinus communis, la curcine de Jatropha curcas et la robinine de l'écorce de Robinia pseudoacacia.

1. Extraction :

Nous nous sommes basés pour l'extraction sur les méthodes employées pour les hemagglutinines étant donné la parenté botanique : la presque totalité des phytohémagglutinines connues se trouvent dans les Légumineuses.

Partie expérimentale :

200 g d'"amandes" broyées sont dégraissées par de l'éther de pétrole. La poudre délipidée est extraite par une solution de chlorure de sodium à 8°/oo, 24 heures à 4°C (4). Après filtration, le marc est extrait par la solution saline 4 heures à 37°C. Les liquides extractifs sont réunis et filtrés.

Une dialyse (5) est alors effectuée, contre l'eau distillée pendant 72 heures à 4°C en utilisant une membrane C 75 Union Carbide. L'absence d'ion chlorure dans l'eau de dialyse est vérifiée par l'action du nitrate d'argent en milieu nitrique, et ce, à intervalles réguliers. Après 72 heures, la dialyse est terminée.

(1) KOBERT op. cit. p. 11.
(2) BROCQ-ROUSSEU et FABRE (R.), Les Toxalbumines, Paris, 1942.
(3) KUNITZ (M.), MACDONALD (M.R.), J. Gen. Physiol. 1948, 32, 25.
(4) COULET (M.), BEZOU (M.J.), COGNET (B.) Bull. Soc. Chim. Biol. 1959, 41, 1835-89.
(5) LUGNIER (A.), DIRHEIMER (G.) C.R. Acad. Sc. Paris, 1971, 273D, 704-7.

La solution protéique est alors centrifugée et après séparation d'un précipité jaunâtre peu important, est lyophilisée (1).

Nous obtenons 6 g d'une poudre jaune très légère, soluble dans l'eau et dans une solution de NaCl à 8°/oo. Le rendement est de 3 % par rapport à l'amande et de 1,5 % par rapport au poids de graines.

2. Etude chimique de cette fraction :

Résultats :

- Réactions de MILLON et du BIURET :

Caractéristiques des protéines, elles sont toutes deux positives.

- Réaction de FEHLING :

Il n'y a pas de réduction donc pas de sucres libres.

- Dosage de l'azote total présent dans la poudre de protéines :

Sur deux échantillons de 125 mg chacun, la teneur moyenne en azote est de 8 %.

Récemment et après notre étude sur ces protéines, nous avons eu connaissance de travaux effectués au Pakistan (2) sur les protéines de Cassia absus, variété récoltée aux Indes. Les auteurs donnent la composition en acides aminés des protéines totales. Ils indiquent une teneur en azote de 12 %. La différence provient certainement de la méthode d'extraction, sélective ici pour les phytohémagglutinines dont la teneur en azote est en général inférieure à 10 % (3).

(1) COULET (M.), CLUZEL (R.) et BEZOU (M.J.), Lyon Pharmaceutique 1966, n° spécial 119-122.
(2) KERMAL (A.) et NAZAR (M.) Pakist. J. Sci. Res. 1967, 19 (1), 4-6.
(3) ROCHAT (J.) Prod. et Probl. Pharm. 1970, 25 (3), 180-185.

- Dosage colorimétrique par la méthode du BIURET :

La teneur en protéines de la poudre est de 93,7 %, pourcentage généralement atteint à ce stade de purification.

- Electrophorèse sur papier (*) :

Elle montre la présence de 3 bandes au niveau des globulines.

- Chromatographie sur résine des acides aminés libres (*) :

Elle nous a permis de connaître la teneur en amino-acides libres qui est de 0,7 %.
Nous avons pu identifier 17 corps dont les plus importants sont :

le groupe acide glutamique-glutamine, puis suivent : ornithine, lysine, valine, alanine, phénylalanine, isoleucine, glycine, arginine, tyrosine, cystine et acide aspartique.

Ces résultats complètent ceux de KERMAL et NAZAR qui n'ont différencié que 8 d'entre eux.

Partie expérimentale (1)

- Dosage de l'azote total par microkjeldahl :

Après minéralisation en présence d'acide sulfurique concentré et à chaud et d'un catalyseur de minéralisation, l'azote est transformé en sulfate d'ammonium. L'ammoniac est alors libéré par la soude, entraîné par la vapeur d'eau et il est capté par une solution titrée d'$H_2 SO_4$ dont on dose l'excès. La distillation est effectuée dans l'appareil de PARNASS et WAGNER.

(*) Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur LATURAZE pour son aide dans la réalisation de ces essais, ainsi que Monsieur SERRE, Interne de Hopitaux.

(1) PERCHERON (F.), PERLES (R.), guide de T.P. Biochimie, Paris, 1967, 30-3

- Dosage colorimétrique par la méthode du BIURET :

Effectué sur une prise d'essai de 8 mg solubilisée dans 1 cm3 de solution saline en présence d'une gamme étalon de sérum albumine.

Préparation de la gamme étalon :

Nos des tubes	0	1	2	3	4	5
Sérum Albumine 10 mg/ml	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
NaCl à 9°/oo	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Réactif de Gornall (*)	4	4	4	4	4	4

Agitation et obscurité 30 minutes - Lecture à 540 nm.

Résultats :

Nos des tubes	0	1	2	3	4	5	Dosage
D.O.	0	13,25	23	33,5	5	51	41,5

- Electrophorèse sur papier :

Réalisée sur appareil MONTAGNE (Brevet GROULADE)

. Papier Schleicher et Schull 2043 Mgl
. Voltage aux bornes 8 m A - 170 V.
. Tampon véronal pH 8,9
. Durée : 5 heures
. Révélation à l'amido-schwartz.

(*) Réactif de Gornall : cholate de sodium à 4 % (p/v) 0,3 ml
Lessive de soude à 10 % (p/v) 3,3 ml
Sulfate de cuivre à 1 % (p/v) 0,4 ml

- Chromatographie sur résine :

Après dissolution de 200 mg de protéines dans 10 ml d'eau, et défécation à l'acide sulfosalicylique (50 mg/ml), le surnageant clair est chromatographié sur résine Chromobed cationique à groupements sulfonés (8 µ) de type C3 Technicon. Le dépôt est de 250 µl correspondant à 5 mg de substance.

3. Essais biologiques :

- Essais d'hémagglutination (1, 2)(*) :

A diverses concentrations de 1 à 10 % dans le chlorure de sodium à 9°/oo, l'extrait est mis en présence de globules rouges humains (groupes A_1, A_2, B, O) et d'hématies de mouton et de lapin. On n'observe d'agglutination dans aucun des cas, non plus que d'hémolyse.

Bien qu'ayant réalisé notre extraction de façon à mettre en évidence une éventuelle phytohémagglutinine, ces résultats ne permettent donc pas de conclure à une telle présence.

- Etude de l'activité mitogénique sur cultures de leucocytes (**) :

Elle est réalisée sur deux échantillons de 0,70 g de protéines
1. dilué dans 5 cm3 de milieu 199
2. dilué dans 2,5 cm3 de milieu 199

Les deux solutions sont filtrées sur membrane Millipore 0,22 .

(1) SAINT PAUL (M.) Transfusion, 1961, 4, 36-37.
(2) MISRA (D.S.) Indian J. of. Exp. Biol. 1966, 4 (3), 161-63.

(*) Les essais ont été réalisés au Centre départemental de Transfusion sanguine de la Tronche sous la Direction et avec l'aide de Monsieur le Professeur MAGNIN. Nous l'en remercions bien vivement.

(**) Monsieur le Professeur JALBERT du Laboratoire de Cytologie de la Faculté de Médecine s'est personnellement intéressé à la réalisation de cette étude dans son laboratoire. Qu'il en soit ici sincèrement remercié.

a) Préparation des cultures :

Tubes	Milieu 199 cm3	Protéines 1 gouttes	Protéines 2 gouttes	Liquémine gouttes	Specilline gouttes	Sang gouttes	Sérum AB cm3
I	15	3		5	6	8	5
II	15	6		5	6	8	5
III	15	12		5	6	8	5
IV	15		2	5	6	8	5
V	15		3	5	6	8	5
VI	15		6	5	6	8	5

Milieu de culture :
Milieu 199 modifié GIBCO (1,25 mg/l de $NaHCO_3$ + glutamine).

b) Culture à 37° pendant 72 heures

c) Préparation des lames

- Bloquage des mitoses : colchicine à 0,001 mg/ml pendant 2 h 30 - centrifugation
- Choc : éclatement des mitoses au sérum de poulain pendant 15 minutes - centrifugation
- Fixations :
  a. 6 volumes d'éthanol + 1 volume d'acide acétique + 3 volumes de chloroforme pendant 30 minutes - centrifugation.
  b. 3 volumes d'éthanol + 1 volume d'acide acétique pendant 10 minutes - centrifugation.
- Etalement sur lames mouillées et froides
- Coloration au Giemsa
- Lecture.

c) Résultats :

Ils sont négatifs pour les deux échantillons étudiés. Il n'y a donc aucun pouvoir mitogénique des fractions séparées par cette méthode.

- Essais de toxicité :

Ils ont été effectués en injection intrapéritonéale sur deux lots de 10 souris (plus un lot témoin) à la dose de 500 mg/kilo.
Cette dose permet d'observer la mort de 3 souris dans un lot et d'une souris dans l'autre.
Les animaux après l'injection, ont la respiration courte, rapide et saccadée. Ils meurent en l'espace de 30 minutes cyanosés, certains après quelques convulsions.
Après une deuxième injection le lendemain, on ne note pas de choc anaphylactique sur les survivants.

De plus, 2 lots de 10 souris ont été nourris pendant 8 jours exclusivement avec de la poudre de graines. Il n'est apparu aucun signe pathologique extérieur.

Il nous semble donc impossible dans l'état actuel des choses, de confirmer la présence d'une toxalbumine dans les graines, soit que la variété du Sénégal n'en possède pas, soit qu'elle soit présente à un taux infime tel que la souris n'y soit pas sensible, soit encore que l'extraction l'évite.

B) - POLYSACCHARIDES.-

1. Séparation et extraction des téguments externes.-

Nous reviendrons sur l'aspect technologique de l'extraction du mucilage au stade industriel. En ce qui concerne son étude chimique, nous avons opéré sur de petites quantités. Un protocole d'extraction a été adopté et nous nous sommes attachés à le respecter au mieux tout au long de nos essais.

50 g de tissus périphériques réduits à l'état de farine (correspondant à 125 g de graines) et 2,5 litres d'eau distillée sont introduits dans un ballon de verre de 5 litres, muni d'un réfrigérant à reflux et d'un agitateur de verre. On chauffe à ébullition avec agitation constante pendant 4 heures. Le liquide d'extraction est passé sur gaze et filtré à chaud sous pression de 1,5 bar en présence de 0,5 % de Dicalite Speedex (adjuvant de filtration). Le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif et précipité par de l'alcool à 96^{c} (2 volumes d'alcool pour un volume de solution mucilagineuse) en agitant constamment au Turbotest.

Le polysaccharide brut se présente sous forme de fibres blanchâtres qui sont séparées et redissoutes dans le minimum d'eau distillée. On précipite à nouveau à l'alcool à 96^{c}. Trois précipitations fractionnées sont ainsi opérées afin de purifier le mucilage.

Celui-ci est mis alors à sécher dans un dessiccateur sous vide, en présence d'anhydride phosphorique et à l'abri de la lumière. Il est ensuite broyé pour faciliter sa redissolution.

On obtient 15 g de mucilage ainsi purifié ce qui donne un rendement de 30 % par rapport aux téguments et de 12 % du poids de graines de départ.

2. Etude chimique.-

- Caractères organoleptiques et aspect :

Le mucilage obtenu se présente sous forme de blocs chamois clair, assez durs, cassant sous la dent, de saveur fade et inodores. Après broyage, on obtient une poudre chamois clair. A ce propos, et nous en reparlerons plus loin lors de l'étude technologique, la couleur du mucilage dépend essentiellement du mode de dessiccation En effet, le mucilage est très oxydable et sensible à l'air et à la lumière, ceci étant probablement dû à des polyphénols extraits en même temps et dont nous apprécierons la présence ultérieurement.

- Solubilité :

Ce mucilage est entièrement hydrosoluble.
Nous avons noté la consistance à plusieurs concentrations :

. à 1 % : solution limpide à froid après agitation au Turbotest.
. à 2 % : gel semi-liquide avec présence de particules gonflées ne se clarifiant pas à la chaleur.
. à 4 % : gel solide à froid.

Il est insoluble dans les solvants organiques et précipite par les alcools éthylique, méthylique, isopropylique.

Le pH de la solution aqueuse est de 6,5.

En ce qui concerne les critères d'identification nous avons mené une étude comparative avec d'autres polysaccharides : gomme arabique (Acacia verek), gomme adragante (Astragalus gummifer), caroube (Ceratonia siliqua), gomme Guar (Cyamopsis tetragonobulus).

Après avoir rappelé le principe des réactions et leur intérêt (1), nous reporterons nos résultats dans un tableau récapitulatif.

- Recherche des sucres libres dans le mucilage :

1 cm3 de solution à 1 % de mucilage est additionné à la température de l'ébullition de 2 cm3 de solution cupro-alcaline (Liqueur de Fehling). Il ne se produit pas de décoloration ni de précipité rouille. Il n'y a donc pas de sucres libres. L'absence de fonctions réductrices libres signifie que plusieurs oses sont liés en position 1-6.

- Recherche des sulfates :

1 cm3 de solution à 1 % de mucilage et 1 cm3 de solution de chlorure de baryum à 6 % p/v ne provoquent ni précipité, ni trouble. Le mucilage ne contient pas de groupement SO_4^{--}, contrairement à l'agar - agar, aux alginates et carraghénates.

- Recherche des tanins :

Elle se révèle négative par action du chlorure ferrique à 9 %.

- Action de l'acétate basique et de l'acétate neutre de Plomb :

à 5 cm3 de solution à 2 % de mucilage, on ajoute :
. 1 cm3 d'acétate basique de Plomb : précipité blanc abondant
. 1 cm3 d'acétate neutre de Plomb à 10 % : gel solide.

La première réaction est commune à la plupart des mucilages uroniques la seconde serait jusqu'à présent plus spécifique des alginates et carraghénates.

- Recherche de l'amidon et des dextrines :

Elle se pratique après chauffage, par action de 0,1 cm3 d'iode 0,I N sur 10 cm3 de solution à 10 %.

(1) BEZANGER-BEAUQUESNE (L.) 1969, Contrat de Recherches Adrapharm n°5

. amidon (témoin) : bleu
. dextrines (témoin) : rouge brun
. mucilage : aucune coloration.

- Hydrolyse acide :

par 5 cm3 d'HCl sur une solution à 5 %.
Elle a pour but de déterminer la présence de sucres par réduction de la liqueur de FEHLING.
Commune à tous les polysaccharides, elle est évidemment positive.
D'autre part, certaines gommes donnent diverses colorations. Le mucilage de Cassia est, lui, incolore. Cette réaction est chimiquement inexpliquée.

- Réaction au naphtorésorcinol :

C'est la réaction de Tollens pour l'identification des acides uroniques

Mode opératoire :

à 0,20 cg de mucilage, on ajoute environ 10 cg de naphtorésorcinol et quelques cm3 d'acide chlorhydrique à 18 %. Après une courte ébullition, il se forme un précipité brun qui passe dans le benzène et le colore en violet.
En présence de témoins, la réaction se révèle positive pour notre mucilage.

Cette réaction peut être confirmée par la méthode de DISCHE (1) modifié par GREGORY (2), utilisant le carbazole pour la caractérisation et le dosage des acides uroniques.

(1) DISCHE (Z.) J. Biol. Chem. 1947, 171, 189.
(2) GREGORY (J.D., Arch. Biochem. Biophys. 1960, 89, 157.

Mode opératoire :

1 cm3 de solution de mucilage à 1 % est ajouté à 1 cm3 de réactif sulfurique boraté refroidi dans la glace.
L'ensemble est porté à ébullition après agitation, puis refroidi.
On ajoute alors 1 cm3 de solution alcoolique à 0,1 % de carbazole.
Après agitation et ébullition, il se produit une coloration violette intense en présence d'acides uroniques.

Nous avons effectué cette réaction en comparaison avec des témoins positif (gomme arabique) et négatif (caroube). Elle s'est révélée positive pour le mucilage de Cassia.

- Réaction au résorcinol :

C'est la réaction de SELIWANOFF pour l'identification des cétoses.

1 cm3 de solution à 2 % est additionné de 0,1 g de résorcinol et de 2 cm3 d'acide chlorhydrique concentré. On chauffe au bain-marie, les colorations suivantes sont observées :
. fructose : coloration rose
. mucilage : aucune coloration, donc absence de cétoses.

- Recherche des alcaloïdes :

Les alcaloïdes signalés dans la littérature pourraient être extraits par l'eau en même temps que le mucilage.
Les réactifs généraux des alcaloïdes appliqués au résidu d'évaporation du mucilage repris par de l'acide chlorhydrique dilué ne donnent aucune réaction.
De même, si l'on alcalinise le mucilage par de la soude et passage en milieu organique, puis acidification et extraction aqueuse, on n'obtient aucune réaction. Le mucilage semble être exempt des alcaloïdes connus de la plante.
Les purifications par 3 précipitations successives sont donc suffisantes

- Réaction au tétraborate de sodium :

Le tétraborate de sodium agit comme gélificateur sur les polysaccharides à groupements hydroxyle en position cis/vic (1), principalement les galactomannanes. La réaction est positive avec le caroube et le Cassia, négative avec les gommes, gélose et alginates.

- Indice de gonflement :

Il permet une première évaluation qualitative du mucilage recueilli après précipitation et dessiccation.
Il est effectué selon la méthode de la Pharmacopée Française (2).

Il est supérieur à 25, ce qui dénote un pouvoir de gonflement important puisque celui de la graine de lin est inférieur à 4, du psyllium à 10 et de la gomme adragante à 11.

Conclusions :

Au vu de ces critères d'identification, le mucilage de Cassia s'apparente beaucoup à la gomme arabique.

Le tableau V, à la page suivante, récapitule ces différents essais.

(1) WHISTLER (R.L.) Methods in Carbohydrate Chemistry, Acad. Press. Inc. 196
(2) Pharmacopée française 8è éd. Paris, 1965, 1501.

TABLEAU V

	Gomme Arabique	Gomme Adragante	Agar-Agar	Gomme Sterculia	Alginates	Mucilage de Caroube	Mucilage de Cassia
Ac. uroniques	+	+	+	+	+	-	+
Cétoses	-	+					-
Tanins	-	-	-	-			-
Borate de Na	-	-	-		-	gel	gel
Ac. neutre de Pb	-	trouble ou précipité	précipité	trouble	gel	gel	gel
Ac. basique de Pb		précipité	-	-			précipité
Amidon Dextrines	-	+ (amidon)	+		-		-
Acide chlorhydrique	incolore	rose		rouge			incolore
Sulfates	-	-	précipité	-	précipité	-	-

Note : Certaines cases laissées vides indiquent que l'essai a été irréalisable ou n'a pas été significatif.

3. Etude chromatographique.-

En vue de cette étude, la plupart des auteurs effectuent une hydrolyse à l'aide d'acide sulfurique mais à concentration et durée variable. SINHA (1) pour l'identification du galactomannane de Desmodium pulchellum utilise $H_2 SO_4$ 2N 18 heures à 100°C. UNRAU (2) lui, pour le polysaccharide des graines de Crotalaria mucronata, l'emploie à la normalité pendant 6 heures à 100°C, et neutralise par le carbonate de baryum. Il fait parallèlement une hydrolyse enzymatique à l'émulsine d'ailleurs reprise par d'autres auteurs (3) avec la pectinase.

R.L. WHISTLER, déjà cité, hydrolyse la gomme guar par $H_2 SO_4$ N pendant 10 heures. Les auteurs français (4, 5) semblent préférer l'acide chlorhydrique à 10 % V/V pendant 6 heures.

Pour quelles raisons observe-t-on de telles variations de concentration et de durée d'hydrolyse ?

Cela tient à la structure complexe des polysaccharides qui sont des assemblages de sucres avec des liaisons plus ou moins solides et résistantes à l'hydrolyse.

Prenons par exemple, la structure spatiale d'un galactomannane simple : Elle se compose (6) d'une chaîne de molécules de mannose (souvent sous forme mannopyranose) en liaison 1-4, et toutes les 3 molécules, d'une liaison 1-6 avec un galactose (galactopyranose).

(1) SINHA (M.P.), TIWARI (R.D.), Phytochemistry 1970, 9, 1881-3.
(2) UNRAU (A.M.), CHOY (Y.M.), Canad. J. Chem. 1970, 48, 1123-8.
(3) HAALAND (E.) Acta Chem. Scand 1969, 23, (7), 2546-8.
(4) POURRAT (H.), POUGET (Mme A.), POURRAT (Mme A.), Ann. Pharm. Fr. 1966, 24 (1), 69-72.
(5) PINKAS (M.), BEZANGER-BEAUQUESNE (Mme L.), TROTIN (F.) C.R. Acad. Sc. Paris, 1965, 261, 843-7.
(6) SMITH (F.) & MONTGOMERY (R.), The Chemistry of Plant gums and mucilage New-York, Reinhold publishing Company, 1959, 337.

Les liaisons 1-6 galactose-mannose sont fragiles et facilement ruptibles : Une hydrolyse par $H_2 SO_4$ N pendant 6 heures doit être suffisante.

Mais pour un composé plus complexe, possédant par exemple des pentoses ou des acides uroniques, et particulièrement dans ce cas, les liaisons sont beaucoup plus solides et difficiles à rompre : une hydrolyse plus drastique, par exemple 2 ou 5 N, 18 heures au bain-marie bouillant est recommandée.

Ces considérations ressortent des premiers essais d'hydrolyse et de chromatographie que nous avons effectués.

Nous avons finalement fait une hydrolyse par l'acide sulfurique 5 N, 18 heures au bain-marie bouillant sous réfrigérant à reflux, puis neutralisation par le carbonate de baryum. Après filtration de l'hydrolysat et évaporation à sec, le résidu est repris par 1 cm3 de pyridine. Les solutions témoins de sucres sont faites à 1 % dans la pyridine et conservées au frais entre les manipulations.

- Techniques utilisées : Elles sont figurées dans le tableau suivant :

TABLEAU VI

	SOLVANT	SUPPORT	REVELATEUR
I.	n. butanol 6 acide acétique 3 eau 1	Silicagel G 1 Alumine G 1	naphtoresorcinol + acide phosphorique
II.	acétate d'éthyle 2 pyridine 1 eau 2	papier Whatman n° 1	phosphate de p. anisidine
III.	n. butanol 4 acide acétique 1 eau 5	papier Whatman n° 1	phtalate d'aniline

STAHL (1) dans son manuel de chromatographie en couches minces, donne de nombreux systèmes de séparation des sucres. Ceux utilisant le Silicage G comme seul support ne donnent pas de séparations suffisamment nettes entre les différents aldoses qui ont pratiquement les mêmes Rf quel que soit le solvant employé.
Le solvant I permet de bien séparer le galactose et le mannose si le glucose est absent du polysaccharide.
Les aldoses sont révélés en bleu, les cétoses en rose et les pentoses en brun.

En ce qui concerne le mucilage de Cassia, encore inconnu, on peut dire qu'il y a deux sucres au niveau du groupe glucose, galactose, mannose mal séparé. On observe des tâches peu caractéristiques au niveau des acides uroniques (révélés en brun).

En mélange complexe, il semble plus difficile d'obtenir des tâches caractéristiques avec une durée de migration simple. Les acides uroniques combinés sont retenus à leur point de départ.

Les chromatographies effectuées sur papier Whatman n° 1, en migration descendante, en employant les solvants II et III, sont plus satisfaisantes. Elles ont permis de séparer le mannose et le galactose mais le glucose a un Rf très proche de ce dernier et reste incertain.
Les acides D-glycuronique et D-galacturonique ont un Rf voisin de 0,1 dans les systèmes utilisés et sont très proches l'un de l'autre.

TABLEAU VII - Rf dans le solvant II

Substance	Mannose	Galactose	Acide D. glycuronique	Acide D. galacturonique	Polysaccharide de Cassia
Rf moyen	0,64	0,42	0,08	0,1	0,1 0,39 0,64

(1) STAHL (E.) Thin Layer Chromatography, Academic Press Ind. Ed. New-York London, 1965.

LEGENDE DES COULEURS OBTENUES EN CHROMATOGRAPHIE

j	:	jaune
br	:	brun
b	:	bleu
b.v	:	bleu-vert
or	:	orangé
v	:	violet
r	:	rose
b.bl	:	bleu blanc
b.p	:	bleu pâle
b.i	:	bleu intense

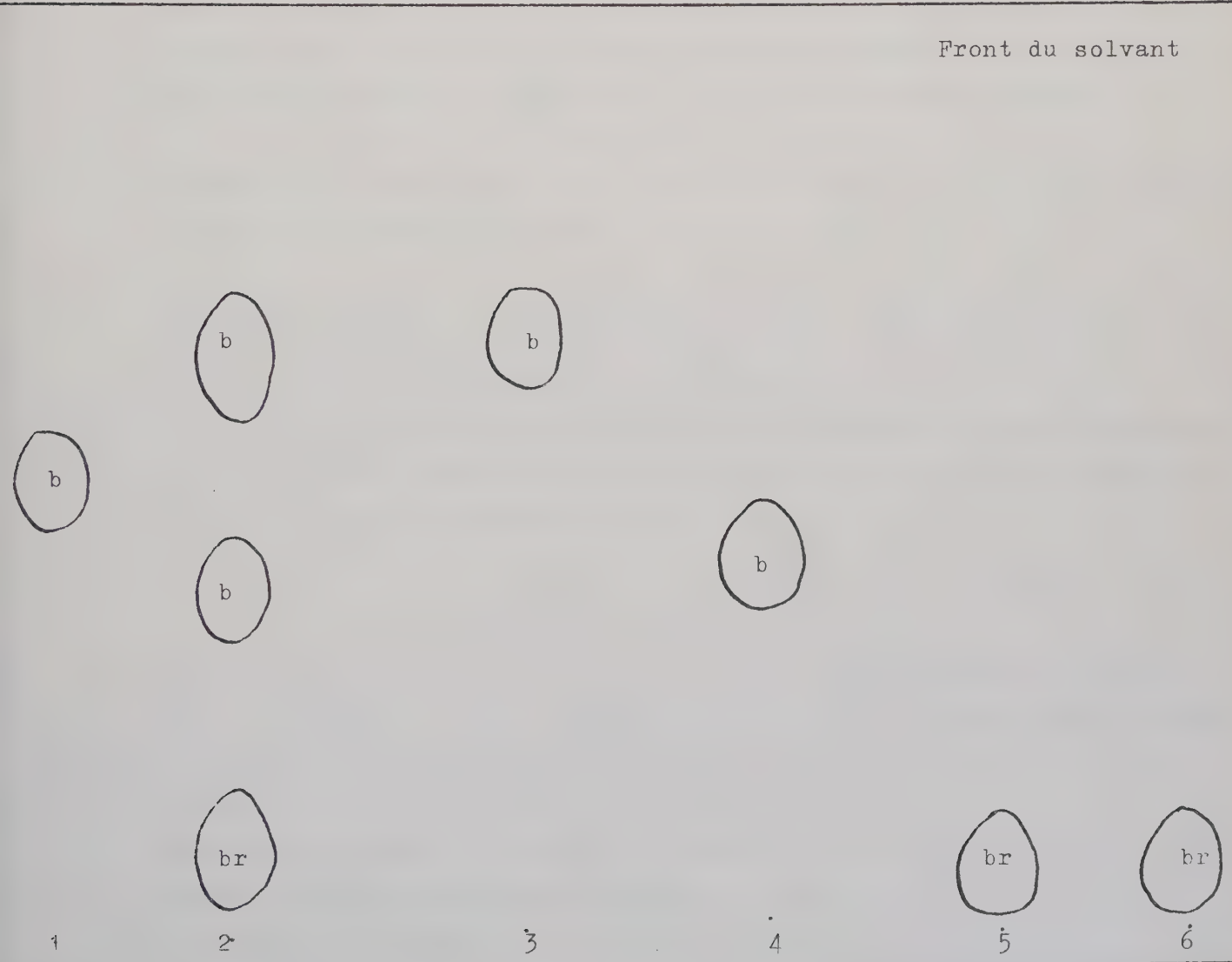
- Chromatographie en couches minces du mucilage hydrolysé.-

Support : silicagel G - alumine G - (1-1)
Solvant : n. butanol - acide acétique - eau - (6-3-1)
Révélateur : naphtorésorcinol + acide phosphorique

1 - Galactose
2 - Mannose
3 - Cassia
4 - Caroube
5 - Glucose
6 - Fructose

- Chromatographie sur papier du mucilage hydrolysé.-

Support : Papier Whatman n° 1
Solvant : n. butanol - acide acétique - eau - (4-1-5)
Révélateur : phtalate d'aniline



1 - Glucose
2 - Cassia
3 - Mannose
4 - Galactose
5 - Ac. D-galacturonique
6 - Ac. D-glycuronique

Ces essais permettent de conclure à la présence :
- de galactose
- de mannose
- d'un acide uronique.

Personnellement, nous pensons qu'il s'agit d'acide galacturonique, la tâche se trouvant toujours à un Rf légèrement plus élevé que celui de l'acide glycuronique témoin.

Un essai d'identification d'osazone par l'action de la dinitro-2,4-phénylhydrazine en milieu acide chlorhydrique à l'ébullition a permis la caractérisation de la mannosazone qui cristallise en filaments.

D'autre part, nous n'avons pas disposé du temps et du matériel nécessaires à l'étude du rapport quantitatif entre les différents sucres.

Néanmoins, la tâche chromatographique correspondant au mannose étant toujours plus intense que celle du galactose, nous possédons déjà une indication sur la prépondérance du mannose.
Récemment, nous avons eu connaissance des travaux (1), (2), portant sur les sucres de C. absus, variété indienne, et identifiant le mannose et le galactose dans le rapport 3 : 1.

Les auteurs, outre le mannose et le galactose, identifient du xylose en petite quantité et nient la présence d'acide uronique.
Nous affirmons notre désaccord sur ce point particulier : En effet, à un an d'intervalle, sur 2 échantillons de mucilage, nous avons effectué un essai chromatographique utilisant le solvant II.

Nous avons chaque fois repéré une tâche au niveau des acides uroniques. De même la réaction d'identification du noyau uronique par la carbazole s'est révélée fortement positive sur tous les échantillons de mucilage étudiés.

(1) KAPOOR (V.P.), MUKERJEE (S.), Current Sci. India 1969, 38 (2), 38-39.
(2) KAPOOR (V.P.), MUKERJEE (S.), Phytochemistry 1971, 10 (3), 655-9.

Nous avons essayé de réaliser le dosage colorimétrique du groupe uroniqu par la méthode au carbazole de DISCHE (1, 2) en présence de borate de sodium qui augmente l'intensité de la réaction de 100 % (3).

La solution mère étalon diluée et la solution à doser sont mises en présence d'acide sulfurique boraté et de réactif au carbazole. Après chauffage à l'ébullition puis refroidissement et repos à l'obscurité, on lit la densité optique à 525 nm.

Lors des essais, notre échantillon se trouvait toujours en dehors de la gamme. Nous avons alors pensé que les autres sucres présents, à savoir galactose et mannose, perturbaient la réaction. En effet, les hexoses ont leur maximum d'absorption vers 318 nm mais absorbent encore un peu à 525 nm.

Mais les acides uroniques absorbent également à 318 nm de sorte qu'il est difficile de séparer un mélange complexe de sucres et d'acides uroniques.

D'autres auteurs ont d'ailleurs rencontré cette difficulté puisque GALAMBOS (4) a mis au point une méthode de dosage de tels mélanges mettant en oeuvre des témoins internes. Ce procédé est compliqué et long à réaliser.

L'auteur précise que sa méthode est valable pour des quantités de sucres ? fois supérieures à l'acide uronique présent dans le mélange. Lorsque ces quantités sont trop importantes, le dosage devient irréalisable, car la coloration violacée des acides uroniques en présence de carbazole est alors instable et vire au brun assez rapidement.

(1) DISCHE (Z.) J. Biol. Chem. 1947, 171-189.
(2) DISCHE (Z.) and ROTHSCHILD (C.) Analytical Biochemistry 1967, 21, (1 125-130.
(3) GREGORY (J.D.) Arch. Bioch. Biophys. 1960, 89, 157.
(4) GALAMBOS (J.T.), Analytical Biochemistry, 1967, 19, 119-132.

Nous sommes certainement dans ce cas, la partie uronique étant négligeable (chromatographiquement) par rapport à la partie osidique.

Nous verrons dans l'étude technologique d'autres caractères physico-chimiques particulièrement intéressants lorsqu'il s'agit d'une plante appelée à devenir industrielle.

Ce polysaccharide apparaît original à plus d'un titre :
Sa solution aqueuse a un pH proche de la neutralité. Il possède un indice de gonflement important et un grand pouvoir gélifiant.

C) - POLYPHENOLS.-

1. Généralités
2. Extraction et fractionnement
3. Etude chromatographique de l'extrait éthéré
4. Etude chromatographique de l'extrait butanolique
5. Essai d'isolement des flavones
6. Etude spectrale en ultra-violet

1. Généralités.-

Dans nos essais préliminaires, nous avions vu que les graines paraissaient riches en polyphénols, par l'intensité de la coloration obtenu dans la réaction de la cyanidine en particulier sur les extraits alcooliques.

Cette impression se confirme lors d'un essai rapide de chromatographi en couches minces sur une teinture au 1/5è (voir page suivante).

2. Extraction et fractionnement.-

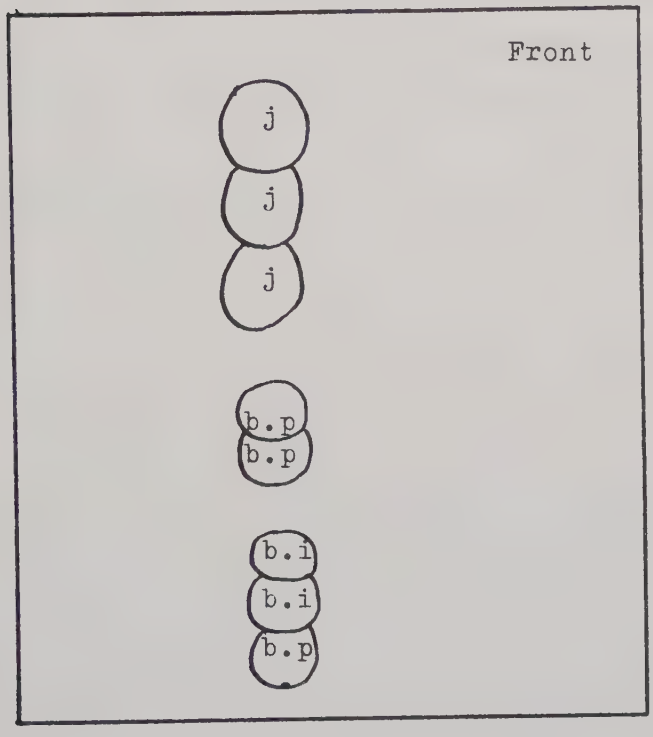
Nous avons réalisé principalement une extraction à partir d'une teinture au 1/5è préparée par macération dans l'alcool à 80°.

La poudre de graines est mise à macérer 24 heures à froid sous agitation mécanique. Après un repos de 48 heures, la teinture est alors concentrée à sec sous vide.

Pour l'étude des polyphénols, le résidu est repris par de l'eau distillée bouillante et filtré à chaud. Le filtrat est placé 48 heure en glacière. Il apparaît un précipité jaune cristallin qui donne une réaction positive à la cyanidine, mais est en quantité trop faible po être recueilli.

- Chromatographie en couches minces d'une teinture au 1/5è.-

Support : polyamide
Solvant : eau - méthanol - méthyléthylcétone - acétone - (13-3-3-1)
Révélateur : U.V. trichlorure d'aluminium.



Les trois tâches révélées en jaune, de Rf supérieur à 0,40 se situent dans la zône des di et triosides.

Il est à noter qu'avec un solvant peu polaire tel que :
benzène - méthyléthylcétone - méthanol - acide acétique - (50-30-30-1), les tâches à fluorescence bleue se trouvent au front du solvant, et les tâches révélées en jaune ont des Rf moins importants.

La solution aqueuse (précipité et surnageant) est donc épuisée plusieurs fois, successivement par l'éther éthylique, l'acétate d'éthyle puis le n. butanol. Les différents extraits sont séchés sur sulfate de sodium anhydre, concentrés puis évaporés à sec et enfin repris par l'éthanol en vue de leur étude chromatographique.

Le schéma de fractionnement est représenté par la figure 2.

Une variante de ce schéma a comporté un traitement à l'éther de pétrole de l'extrait alcoolique-concentré, mais ne nous a pas apporté d'amélioration essentielle, donc n'a pas été retenue.

Les différents protocoles utilisés sont inspirés des travaux d'EGGER (1) et de LEBRETON (2).

(1) EGGER (K.) Planta Medica, 1964, 3, 265-71.

(2) LEBRETON (Ph.)

a) Contribution à l'étude des flavonoïdes chez Humulus Lupulus L. et d'autres urticales. Thèse Dr. es Sc. Lyon, 1962, n° 291.

b) Introduction à l'étude des flavonoïdes du houblon - Thèse Facult des Sc. Lyon, 1960.

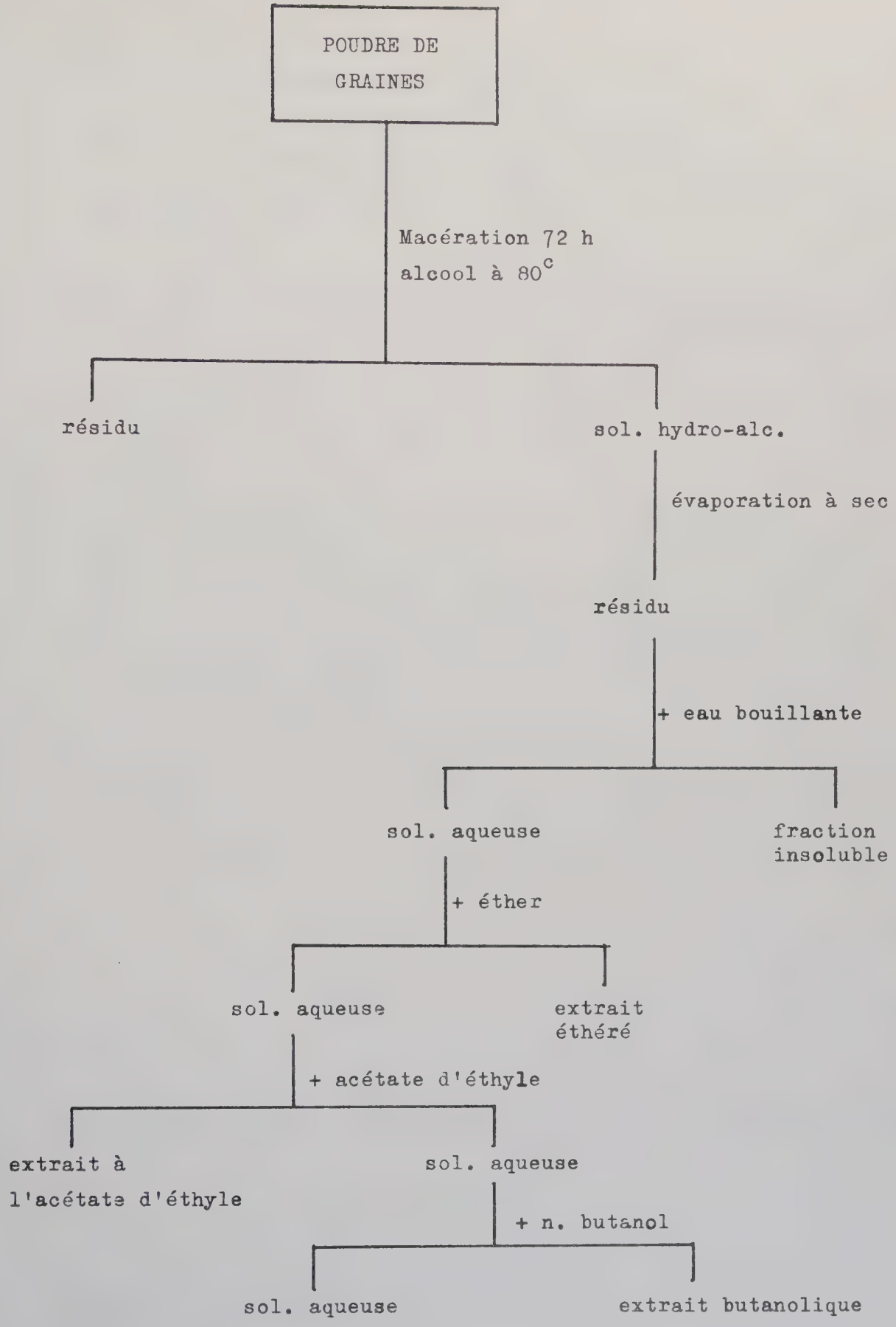


Figure 2 - Schéma de fractionnement des polyphénols.-

3. Etude chromatographique de l'extrait éthéré.-

Cet extrait évaporé à sec se présente sous une forme résineuse colorée en jaune assez foncé, insoluble dans l'eau, soluble dans l'alcool éthylique absolu.

Une rapide chromatographie en couches minces de cet extrait nous permet de voir qu'il est particulièrement riche en acides phénols :

On note la présence d'au moins six tâches bien distinctes, dans les conditions indiquées (support 1 - solvant A).

Nous avons essayé de purifier cet extrait par traitement de la solution éthérée par une solution de carbonate acide de sodium à 5 %. Dans ces conditions, selon RIBEREAU-GAYON (1), seuls doivent passer dans la solution alcaline les acides phénols. La phase alcaline est donc séparée et réacidifiée. Les acides phénols sont ensuite extraits par l'éther éthylique.

C'est sur ce dernier extrait éthéré purifié, séché et concentré comme précédemment que sera faite l'étude chromatographique des acides phénols. Pour parvenir à leur identification, il nous a fallu associer plusieurs techniques en couches minces et sur papier.

(1) RIBEREAU-GAYON (P.) Les composés phénoliques des végétaux, Paris, Dunod éd. 1968.

Techniques utilisées :

a) couches minces.-

1 - Support : Cellulose
Solvants : A) acide chlorhydrique 0,1 N (1)
B) acide chlorhydrique - acide acétique - eau (3-1-20)(2
C) acide acétique à 5 %

2 - Support : Gel de Silice G
Solvant : D) benzène - acide acétique - eau (2-1-1) (3)

b) Papier.-

Support : papier Whatman n° 1
Solvants : A - C
E) benzène - acide acétique - eau (6-7-3) (4)
F) formiate de sodium - acide formique - eau (10-1-200)
G) BAW : n. butanol - acide acétique - eau (4-1-5).

En outre, nous avons utilisé la technique proposée par RIBEREAU-GAYON (5) qui, bien que longue à mettre en œuvre, apporte des précisions intéressantes et nous a permis de confirmer les résultats obtenus avec les systèmes précédents.

Cette méthode utilise 2 systèmes de solvants en migration descendante, sur papier Whatman n° 1.

(1) PARIS (R.), MURGU (Mme M.), Pl. Med. et Phytotherapie 1970, 4 (2), 138-49.
(2) COURBET (H.), METCHE (M.), C.R. Acad. Sc. Paris, 1971, 272D, (12), 1086-89.
(3) MINALE (L.), PIATELLI (M.), DE STEFANO (S.), NICOLAU (R.A.), Phytochemistry 1966, 5, 1037.
(4) PARIS (R.), HERISSET (A.), CHAUMONT (J.P.), C.R. Acad. Sc. Paris, 1968, 267D, 740-2.
(5) RIBEREAU-GAYON (P.) op. cit. p.48.

Solvant I

Toluène - acide acétique - eau - (4-1-5)

2 migrations dans le même sens sont réalisées :

- 1ère migration : 6 heures

  Elle permet la séparation théorique des acides suivants : sinapique, férulique, syringique, p. coumarique, vanillique et salicylique.

- 2ème migration : 48 heures

  Doit séparer les acides p. hydroxybenzoïque, gallique et chlorogénique qui restent au point de départ dans la migration de 6 heures.

Solvant II

Benzène - acide acétique - eau - (6-7-3)

Une migration de 72 heures sur une troisième feuille de papier après élution par l'acide acétique à 1 % du spot de départ doit séparer les acides protocatéchique et caféique.

Pour l'ensemble de ces chromatographies, nous avons utilisé les révélateurs suivants :

1 - Lumière de Wood (U.V.)

  La plupart des acides phénols apparaîssent avec une fluorescence bleue ou verte plus ou moins intense.

2 - U.V. + vapeurs d'ammoniaque

  L'ammoniaque modifie la fluorescence de certains acides.

3 - Réactif de SWAIN (1)

Il consiste en une pulvérisation de paranitraniline diazotée en milieu acide. Après avoir noté les colorations, on pulvérise aussitôt une solution de $Na_2 CO_3$ à 15 %. On peut également pulvériser à nouveau après séchage, la solution de p. nitraniline mais si la pulvérisation est trop forte, on risque de masquer certaines tâches par une coloration rouge violacée dûe à la présence d'un sel de diazonium libre. C'est le révélateur le plus intéressant car outre la localisation par les Rf, il donne des colorations caractéristiques à 2 échelons avec la plupart des acides.

4 - Réactif de BARTON (2)

Il révèle les acides phénols en bleu intense par pulvérisation successive d'une solution aqueuse de $Fe Cl_3$ à 1 % puis d'une solution de ferricyanure de potassium à 0,5°/oo dans l'eau.
Il n'y a pas de différenciation caractérisée par la couleur. Tous les acides phénols sont révélés en bleu sur fond jaune. Seul, le Rf permet ici une interprétation.

Nous avons donc expérimenté de nombreux systèmes. Les meilleurs résultats ont été obtenus sur cellulose avec le solvant A et sur papier Whatman n° 1 avec la triple migration dans 2 systèmes de solvants.

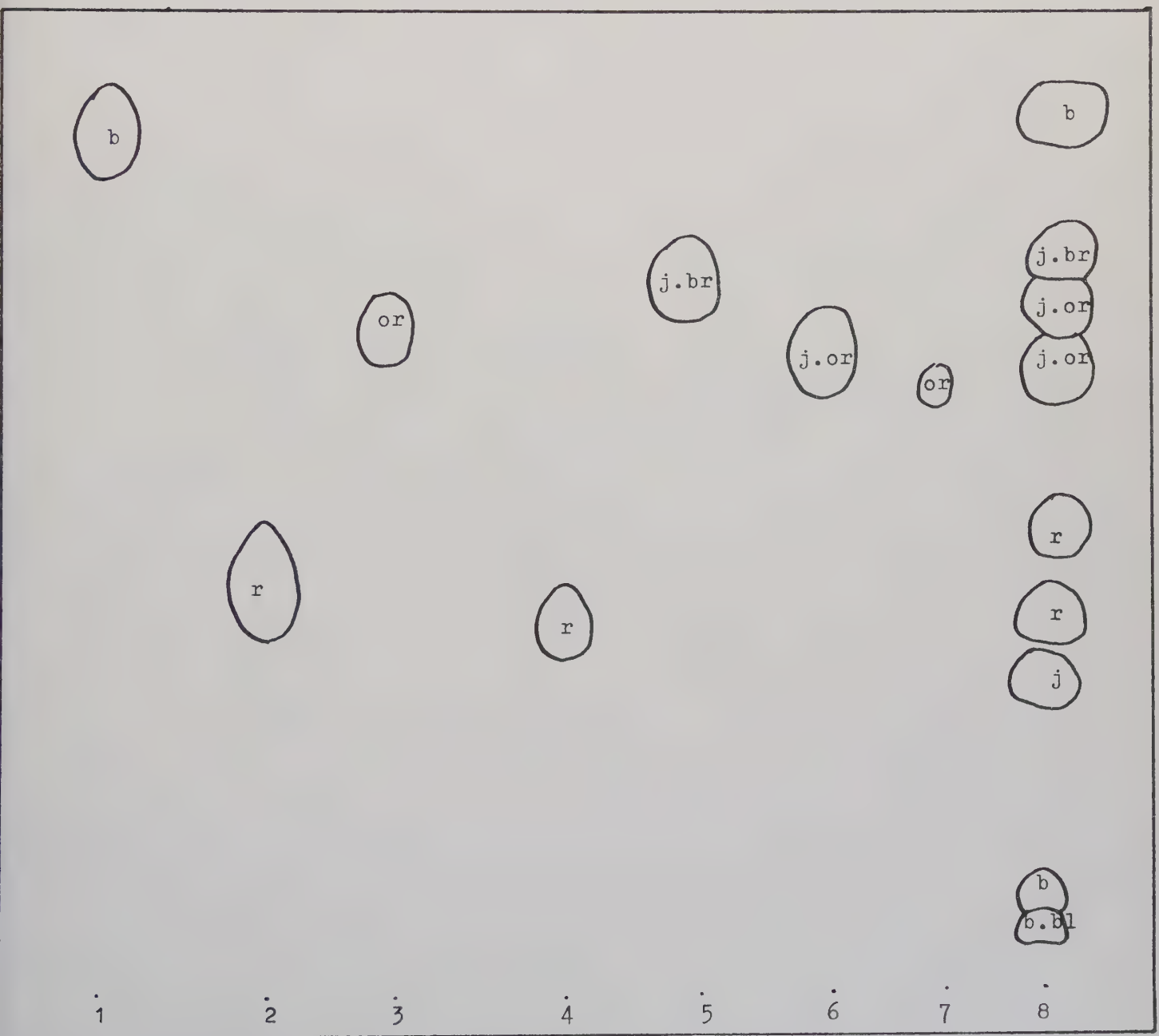
Les autres systèmes ont, soit confirmé nos résultats, soit n'ont pas donné de séparations satisfaisantes.

Dans les pages qui suivent, nous rendons compte des chromatographies les plus significatives.

(1) SWAIN (T.) Biochem. J. 1952, 53, 200.
(2) BARTON (G.M.), EVANS (R.S.), GARDNER (J.A.F.) Nature, 1952, 170, 249.

- Chromatographie en couches minces des acides phénols.-

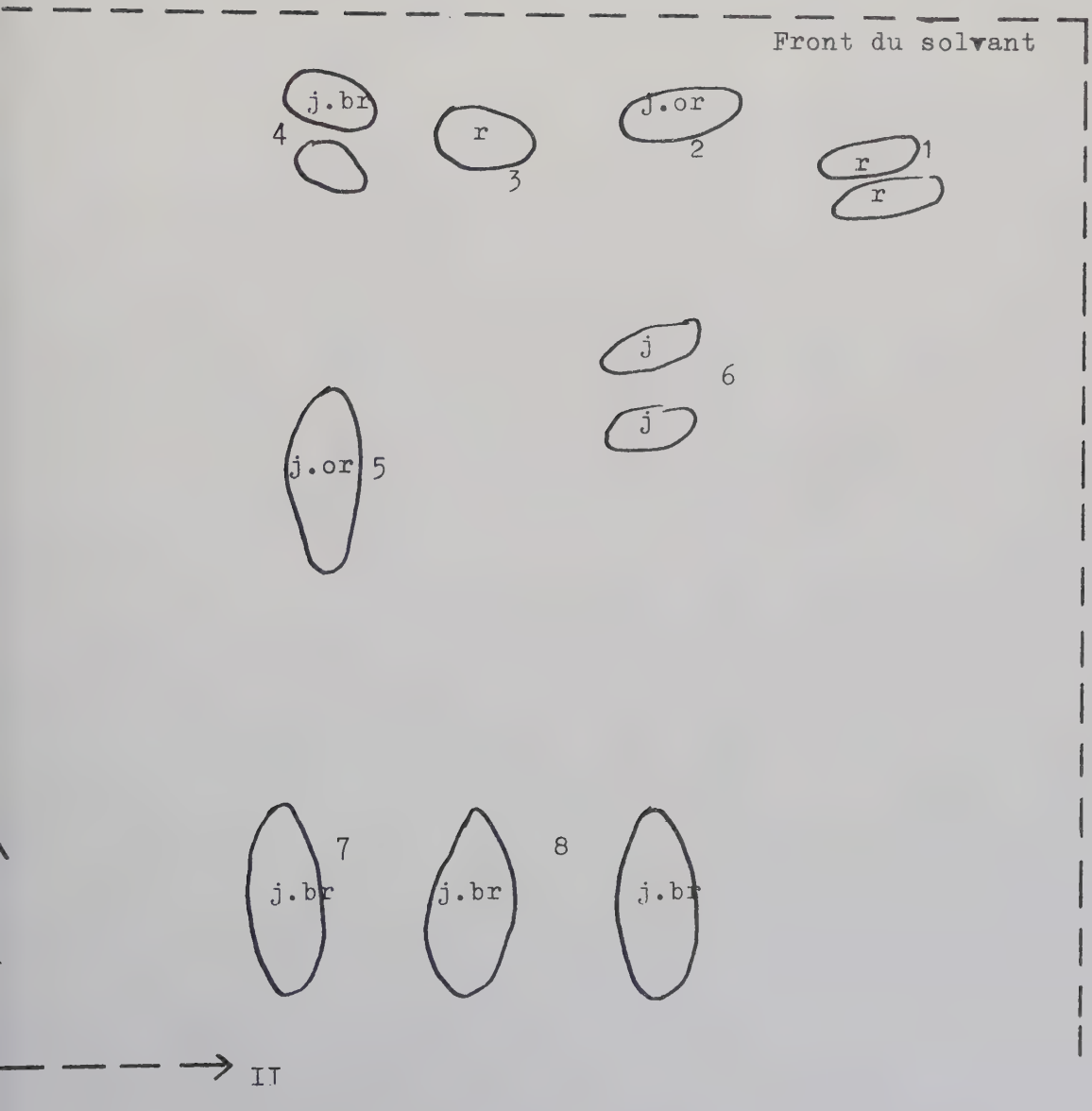
Support : cellulose
Solvant : HCl 0,1 N
Révélateur : Réactif de SWAIN.



1 - a. salicylique
2 - a. férulique
3 - a. vanillique
4 - a. sinapique
5 - a. p. hydroxybenzoïque
6 - a. protocatéchique
7 - a. syringique
8 - extrait éthéré

- Chromatographie bidimensionnelle de l'extrait éthéré.-

Support : Papier Whatman n° 1
Solvants : I - benzène - acide acétique - eau - (6-7-3)
II - formiate de sodium - acide formique - eau - (10-1-200
Révélateur : Réactif de SWAIN



1 - a. sinapique
2 - a. vanillique
3 - a. férulique
4 - a. p. hydroxy-benzoïque
5 - a. protocaté-chique

TABLEAU VIII

- Chromatographie de l'extrait éthéré purifié en présence de témoins :

Support : papier Whatman n° 1
Solvant A : HCl 0,1 N
Révélateurs : U.V. - Réactif de SWAIN.

Acides témoins	Rf	U.V.	R. de SWAIN	$Na_2 CO_3$
a. sinapique	0,25	bleu vert	rose	gris bleu
a. férulique (cis et trans)	0,30) 0,61)	bleu vert	rose	gris vert
a. syringique	0,45	-	orangé	bleu
a. protocatéchique	0,48	-	jaune brun	violet
a. vanillique	0,53	-	jaune	violet
a. p. hydroxybenzoïque	0,58	-	jaune	rouge
a. salicylique	0,63	bleu	jaune pâle	-

Extrait éthéré	Rf
a. sinapique	0,27
a. férulique	0,30
a. protocatéchique	0,47
a. vanillique	0,53
a. p. hydroxybenzoïque	0,58
a. salicylique	0,68

TABLEAU IX

- Chromatographie de l'extrait éthéré purifié :

Support : papier Whatman n° 1
Solvant C : acide acétique à 5 %
Révélateurs : U.V. + réactif de SWAIN

Acides témoins	Rf	Extrait éthéré Rf trouvés
a. sinapique	0,39	0,33
a. férulique	0,45	0,43
a. syringique	0,57	
a. vanillique	0,7	0,7
a. protocatéchique	0,74	0,76
a. p. hydroxybenzoïque	0,8	0,8

TABLEAU X

- Rf des acides phénols de l'extrait éthéré dans les solvants I et II de RIBEREAU-GAYON :

Acides	Rf	
a. p. coumarique	0,11	Solvant I (1ère migration)
a. sinapique	0,25	
a. férulique	0,41	
a. vanillique	0,35	
a. salicylique	0,9	
a. p. hydroxybenzoïque	0,15	(2ème migration)
1 tâche non identifiée	0,01	
a. protocatéchique	0,15	Solvant II

Par cette série de chromatogrammes, nous pouvons conclure à la présence d'au moins 7 acides phénols :

1 - Acide férulique :
Fluorescence bleu vert en U.V. puis coloration rose et gris-bleu par le réactif de SWAIN. Présence des dérivés cis et trans.

2 - Acide sinapique :
Fluorescence bleu-vert en U.V. puis coloration rose et gris-vert par la réactif de SWAIN. Présence des dérivés cis et trans.

3 - Acide p. hydroxybenzoïque :
N'est pas fluorescent en U.V. mais coloré en jaune pâle puis en rouge par le réactif de SWAIN.

4 - Acide protocatéchique :
Pas de fluorescence en U.V. mais coloration jaune brun puis mauve au réactif de SWAIN.

5 - Acide vanillique :
Coloration jaune pâle puis violette au réactif de SWAIN.

6 - Acide salicylique :
Fluorescence bleu intense à 256 nm et Rf bien différencié.

7 - Acide paracoumarique :
Coloration jaune puis bleue au réactif de SWAIN.

D'autres acides phénols existent dans cet extrait, que nous n'avons pu déterminer avec certitude.
Une tâche à fluorescence bleu blanc très intense, restant au niveau du dépôt, avec tous les solvants essayés nous a toujours intrigués. Il pourrait s'agir d'un dérivé coumarinique ou de l'acide chlorogénique.

L'extrême richesse de ces graines en acides phénols est un fait nouveau, non signalé dans la littérature concernant les Cassia et Cassia absus en particulier.

La présence, notamment, d'acide salicylique à action antiinflammatoire peut certainement conduire à la découverte de propriétés thérapeutiques intéressantes.

4. Etude chromatographique de l'extrait butanolique.-

L'extrait au butanol ainsi que celui à l'acétate d'éthyle sont obtenus par fractionnement comme l'extrait éthéré précédemment étudié.
Tous deux donnent une coloration orangée à la réaction de la cyanidine ce qui dénote la présence de flavones.

Une chromatographie rapide de ces extraits permet de noter qu'ils sont semblables dans les deux cas, mais l'extrait butanolique, le plus fortement coloré, est le plus riche. C'est donc lui que nous étudierons en particulier.

Nous avons effectué des migrations simples et bidimensionnelles dans différents systèmes :

Support : polyamide à 5 % de cellulose
Solvants :
I - eau - méthanol - méthyléthylcétone - acétone (13-3-3-1)
II - benzène - méthyléthylcétone - méthanol - acide acétique (50-30-30-1)
Révélateurs : - oxychlorure de zirconium à 3 % dans le méthanol
- trichlorure d'aluminium à 5 % dans l'alcool à 96°.

Support : gel de silice H
Solvant : A.P.E.M.
III - acétate d'éthyle - pyridine - eau - méthanol (80-12-10-5) (1)
Révélateur : acétate basique de Plomb.

Support : Papier Whatman n° 20
Solvant :
IV - acide acétique à 15 %
Révélateur : acétate basique de Plomb.

(1) CHOPIN (J.) in WAGNER (H.), HORHAMMER (L.), Pharmacognosy and Phytochemistry, 1971, 117-28.

L'extrait butanolique chromatographié dans le solvant I (polaire) laisse apparaître deux tâches, de Rf 0,66 et 0,74, révélées en jaune par le trichlorure d'aluminium.

Dans le solvant II (apolaire) les Rf de ces deux tâches sont respectivement de 0,16 et 0,3.

D'après les travaux de K. EGGER (1) sur support de polyamide, le solvant I permet d'apprécier le degré de glycosylation des flavonoïdes et le solvant II le degré d'hydroxylation des génines.

Dans le solvant I, en partant des Rf les plus bas vers les Rf les plus élevés, on doit trouver les : 3-glycuronides, 3-arabinosides, 3-rhamnosides, 3-glucosides et galactosides, 3-dirhamnosides, 3-diglucosides, 3-7 diosides et les triosylés sur des carbones différents.

Le solvant II, moins polaire, libère plus vite les aglycones les moins hydroxylés (ou dont les hydroxyles sont bloqués) et ceux-ci ont les Rf les plus forts.

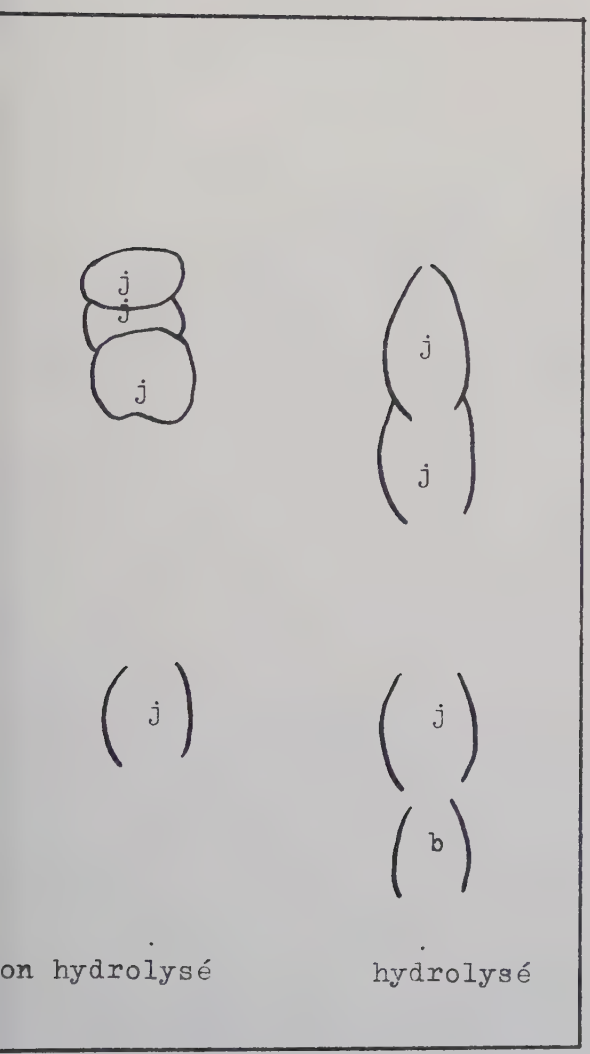
Les tâches majeures que nous observons dans l'extrait butanolique se trouvent au niveau des diosides et semblent correspondre à des génines faiblement hydroxylées.

Nous avons réalisé alors une hydrolyse chlorhydrique de l'extrait :
L'extrait butanolique concentré à sec est repris par 30 cm3 d'alcool à 96° puis divisé en 2 parties aliquotes que l'on acidifie par HCl N.
Une partie est hydrolysée 1 heure, l'autre 4 heures.
Les hydrolysats sont alors extraits successivement par l'éther, l'acétate d'éthyle et le butanol.
Ce sont les extraits butanoliques hydrolysés pendant 1 et 4 heures qui seront chromatographiés sur polyamide en utilisant les solvants I et II.
On retrouve sur les chromatographies des extraits hydrolysés, les mêmes tâches révélées en jaune par $AlCl_3$, qu'avant hydrolyse. Il n'y a pas de séparation de l'aglycone et des sucres. Nous serions donc en présence de C. glycosides non hydrolysables. Quelques tâches supplémentaires apparaissent néanmoins après hydrolyse.

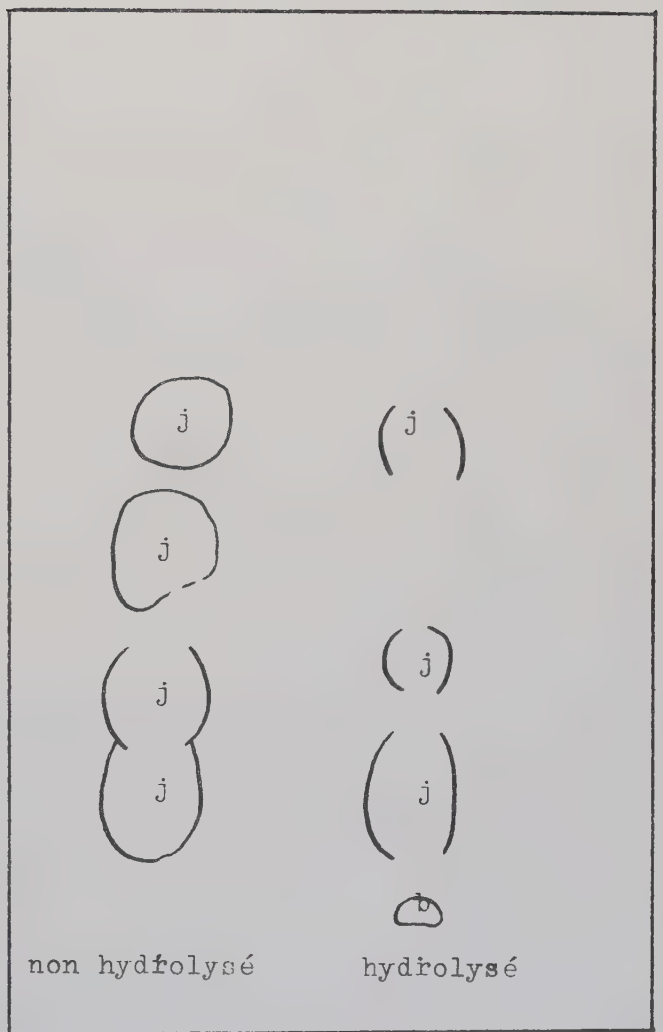
(1) EGGER (K.) Planta Medica 1964, 2, 265-71.

- Chromatographie en couches minces de l'extrait butanolique.-

Support : polyamide à 5 % de cellulose
Révélateur : trichlorure d'aluminium.



Solvant I



Solvant II

- Chromatographie en couches minces de l'extrait butanolique hydrolysé.

Support : polyamide à 5 % de cellulose

Solvants : Dimension I :

eau - méthanol - méthyléthylcétone - acétylacétone - (13-3-3-1)

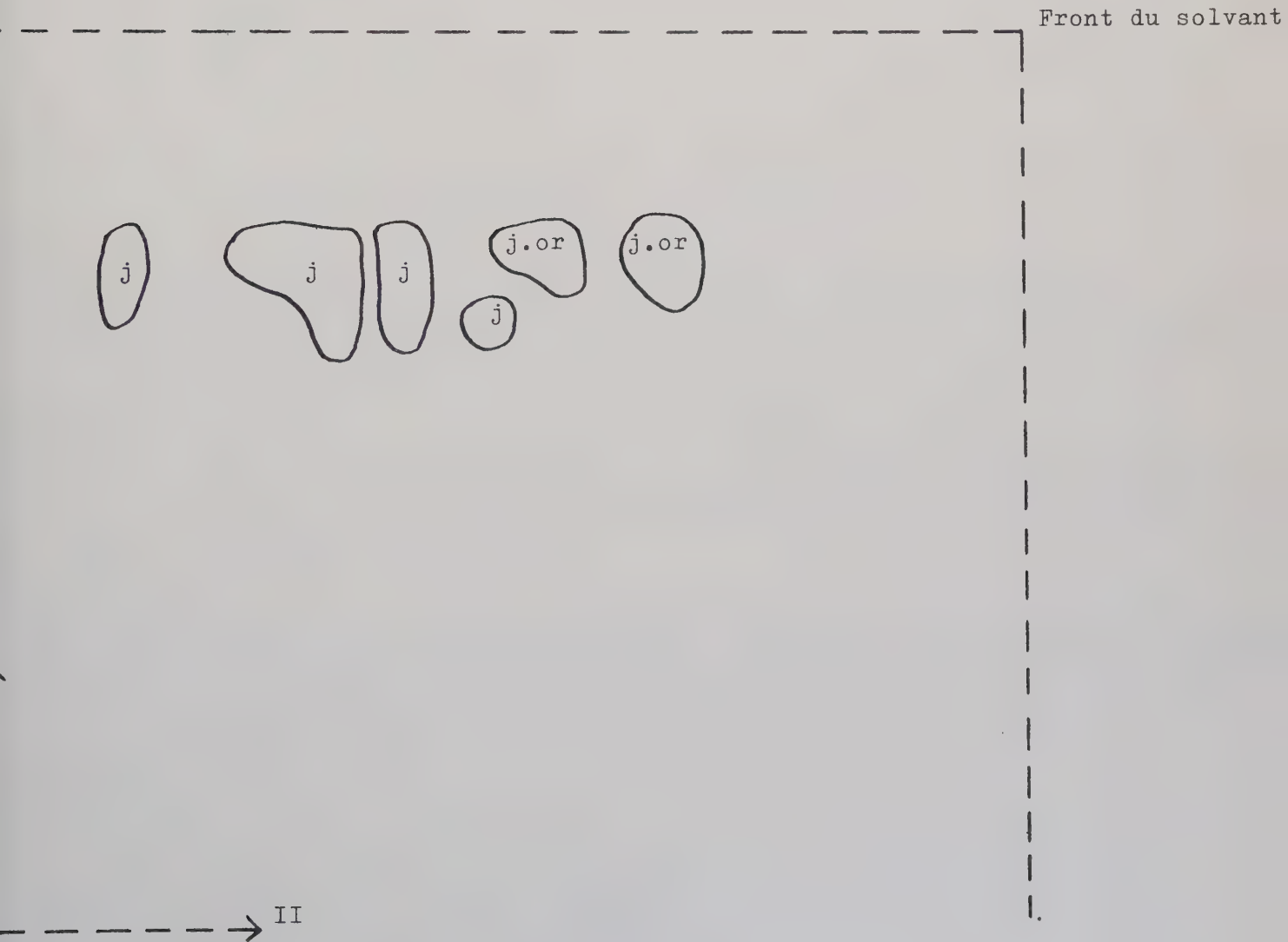
(durée de migration : 3 h)

Dimension II :

benzène - méthyléthylcétone - méthanol - acide acétique (50-30-30-1)

(durée de migration : 4 h 30)

Révélateur : acétate basique de Plomb



5. Essai d'isolement des flavones.-

300 g de graines sont broyés jusqu'à granulométrie comprise entre les modules 26 et 32. Une farine ainsi homogène permet une plus grande surface de contact avec le solvant d'extraction.

On effectue un dégraissage à l'éther de pétrole par lixivation. La solution éthéropétrolique est évaporée à sec (rendement 6 %) et reprise par du méthanol. Cet extrait sera étudié plus loin. Sur cette poudre ainsi dégraissée on fait une lixivation à l'alcool à 90°.

Le lixiviat est concentré à l'évaporateur rotatif jusqu'à consistance sirupeuse. Ce résidu est agité avec de l'éther de pétrole après addition préalable d'eau pour séparer les phases. La phase éthéropétrolique se colore en vert parachevant ainsi la purification.

La phase aqueuse ainsi purifiée est ajustée à l'aide d'eau distillée à un volume de 300 cm3 (1 cm3 = 1 g de graines).

Elle est ensuite épuisée successivement par l'éther éthylique et le butanol. Les solutions organiques sont évaporées à sec et reprises par du méthanol.

Nous nous intéresserons à l'extrait butanolique. Lors de la mise en solution dans le méthanol, on observe l'apparition d'un abondant précipité cristallin.

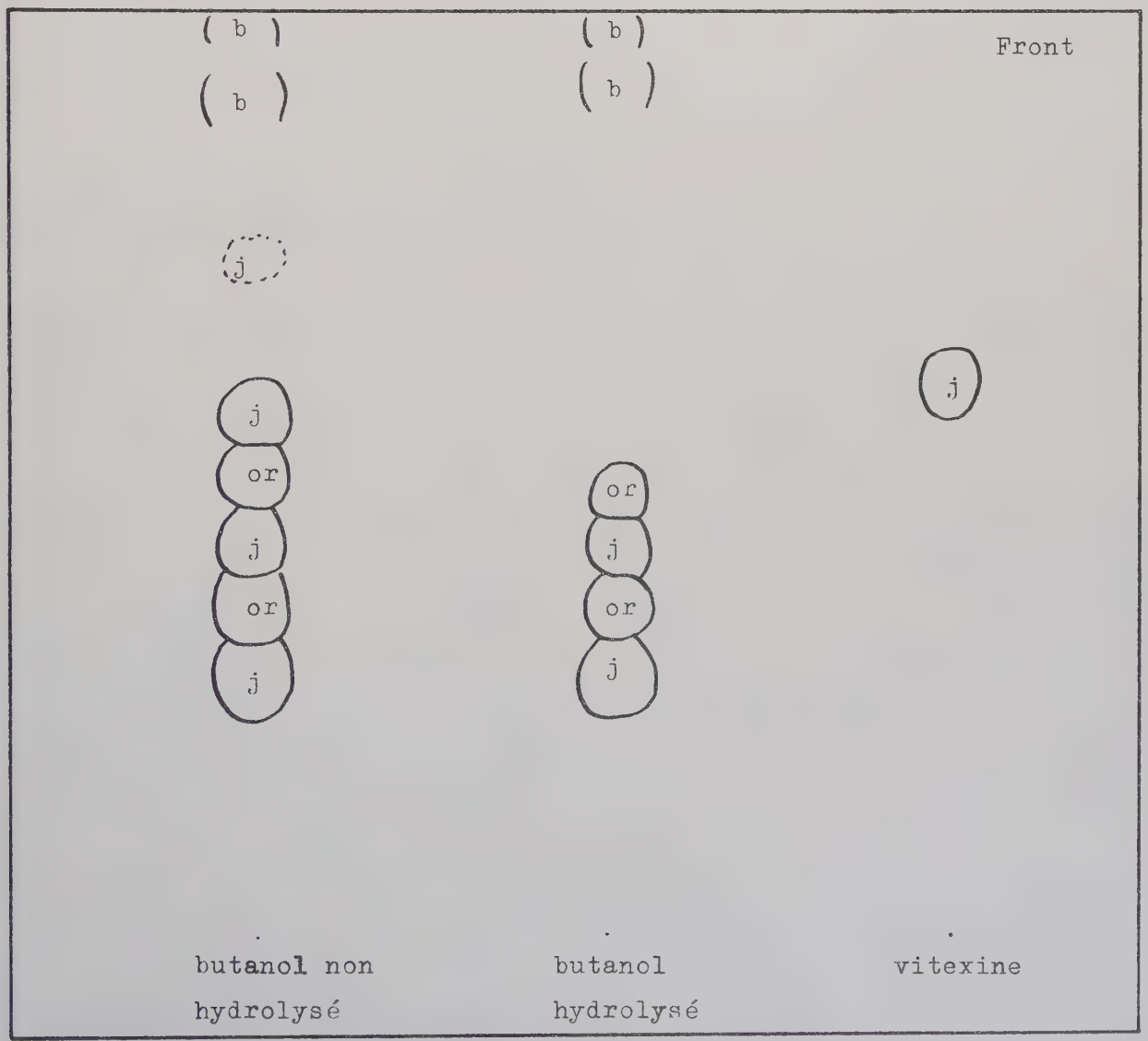
Ce précipité est lavé au méthanol jusqu'à ce que le solvant de lavage soit incolore. Il est alors séché sous vide phosphorique. Nous l'appellerons Substance X. Nous développerons son étude dans un chapitre ultérieur.

La solution surnageante examinée en chromatographie confirme les résultats antérieurs et révèle la présence d'autres flavonoïdes en quantités faibles.

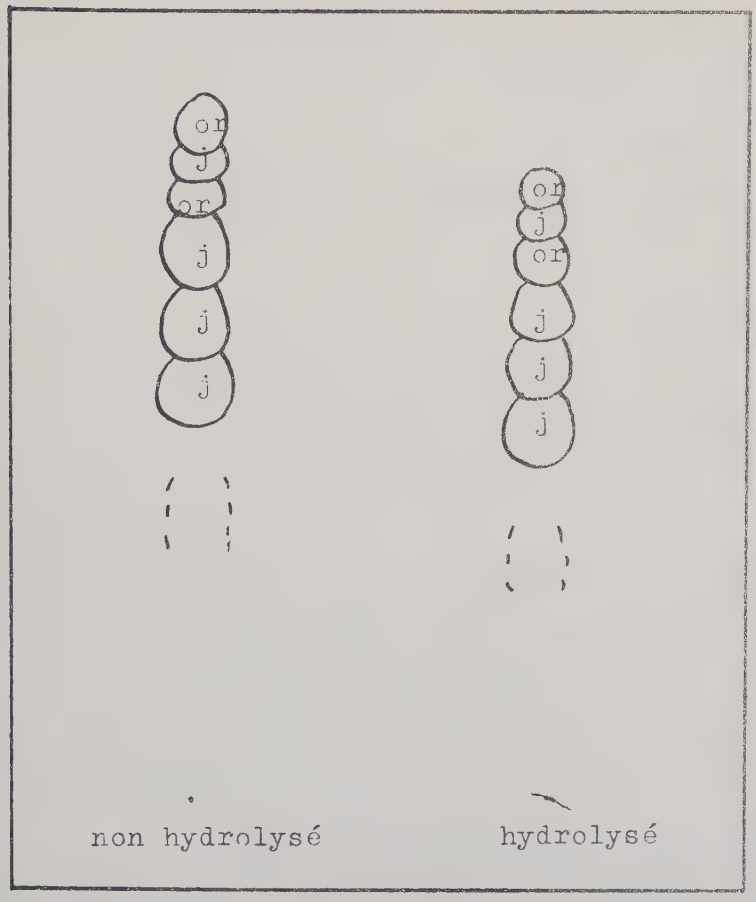
L'hydrolyse acide confirme, en ce qui concerne les 2 substances principales, qu'il s'agit de composés non hydrolysables. Leur séparation en bandes après chromatographie en couches minces nous a conduit à l'étude spectrale qui va suivre.

- Chromatographie en couches minces de l'extrait butanolique.-

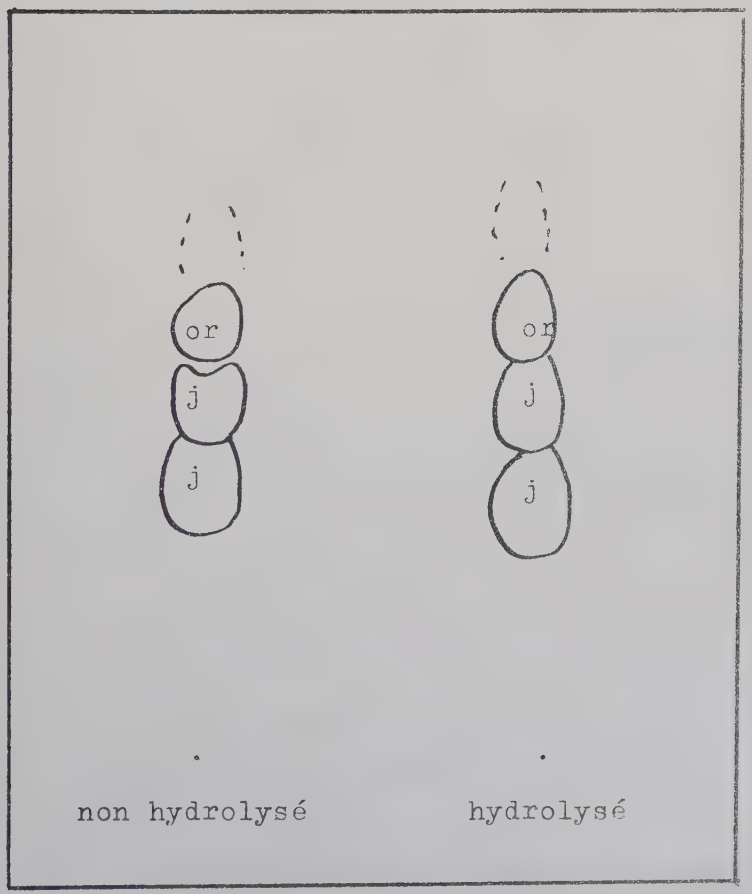
Support : gel de silice H
Solvant : acétate d'éthyle - pyridine - eau - méthanol - (80-12-10-5
Révélateur : acétate basique de Plomb



- Chromatographie sur papier Whatman n° 2 de l'extrait hydrolytique.-



Solvant : n. butanol - acide acétique
eau - (4-1-5)
Révélateur : acétate basique de Plomb



Solvant : acide acétique à 5 %
Révélateur : acétate basique de Plomb.

6. Etude spectrale en ultra-violet .-

Ne pouvant à ce stade pousser plus loin l'étude chromatographique, nous avons essayé d'obtenir quelques renseignements des spectres ultra-violets.

Nous avons, pour cela, effectué des dépôts en bande de l'extrait butanolique sur polyamide. La migration se fait dans le solvant I. Un fois repérées par développement partiel les bandes sont grattées et éluées par l'éthanol absolu.

Une bande de polyamide au front du solvant est grattée et éluée de la même façon pour servir de témoin.
Les deux bandes que nous avons éluées correspondent aux 2 tâches de Rf 0,66 et 0,74 dans le solvant I.

Leur spectre tracé au spectrophotomètre UNICAM SP 800 est bien un spectre de flavonoïde à deux maxima.
Les deux spectres sont d'ailleurs très semblables, qu'il s'agisse de solutions éthanoliques pures ou additionnées de réactifs.
Les deux composés ne doivent différer que par leur copule glucidique (ou acyl) étant donné leur différence de Rf.
On sait que les sucres n'interviennent pratiquement pas sur le spectr U.V. de ces corps.

TABLEAU XI

	Bande II	Epaulements	Bande I
Produit seul (solvant éthanolique)	275		336
+ acétate de Na	285	305	345 (+ 9)
+ éthylate de Na	285	305 342	401 (+ 65)
+ acétate Na + H_3 BO_3	285	320	345 (+ 9)
+ Al Cl_3	283	307 348	389 (+ 53)

- L'acétate de sodium provoque un déplacement bathochrome de la bande II ce qui signifie la présence d'un OH libre en 7.

- L'éthylate de sodium ionise tous les hydroxyles libres. Le déplacement important de la bande I montre la présence d'un OH libre en 4'.

- Le trichlorure d'aluminium provoque une chélation soit entre 2 OH placés en ortho soit entre un OH et une fonction C = O. Elle se traduit par un effet bathochrome des deux bandes (+ 53 nm). Cependant, l'acide borique ne modifie pas l'effet bathochrome de l'acétate de sodium. Il n'y a donc pas 2 OH en ortho.

  Par ailleurs la réaction orangée de la cyanidine de même que la zone de maxima de la bande I indique qu'il s'agit de flavone et non d'un flavonol. Il y a donc un OH libre en 5.

  Nous avons également fait un examen de cette substance en solution méthanolique et en faisant agir le trichlorure d'aluminium seul, puis en milieu acide chlorhydrique.

  L'addition d'acide chlorhydrique n'amène pratiquement pas de variation. Il n'y a donc pas 2 OH en ortho. En milieu acide, seule la chélation entre le carbonyle et un OH voisin est stable. Un hydroxyle existe donc en 5 puisqu'il s'agit de flavone.

TABLEAU XII

	Bande II	Epaulements	Bande I
Produit seul (méthanol)	273		332
+ $AlCl_3$	281	306 347	382 (+ 50)
+ $AlCl_3$ + HCl	281	305 344	381 (+ 49)

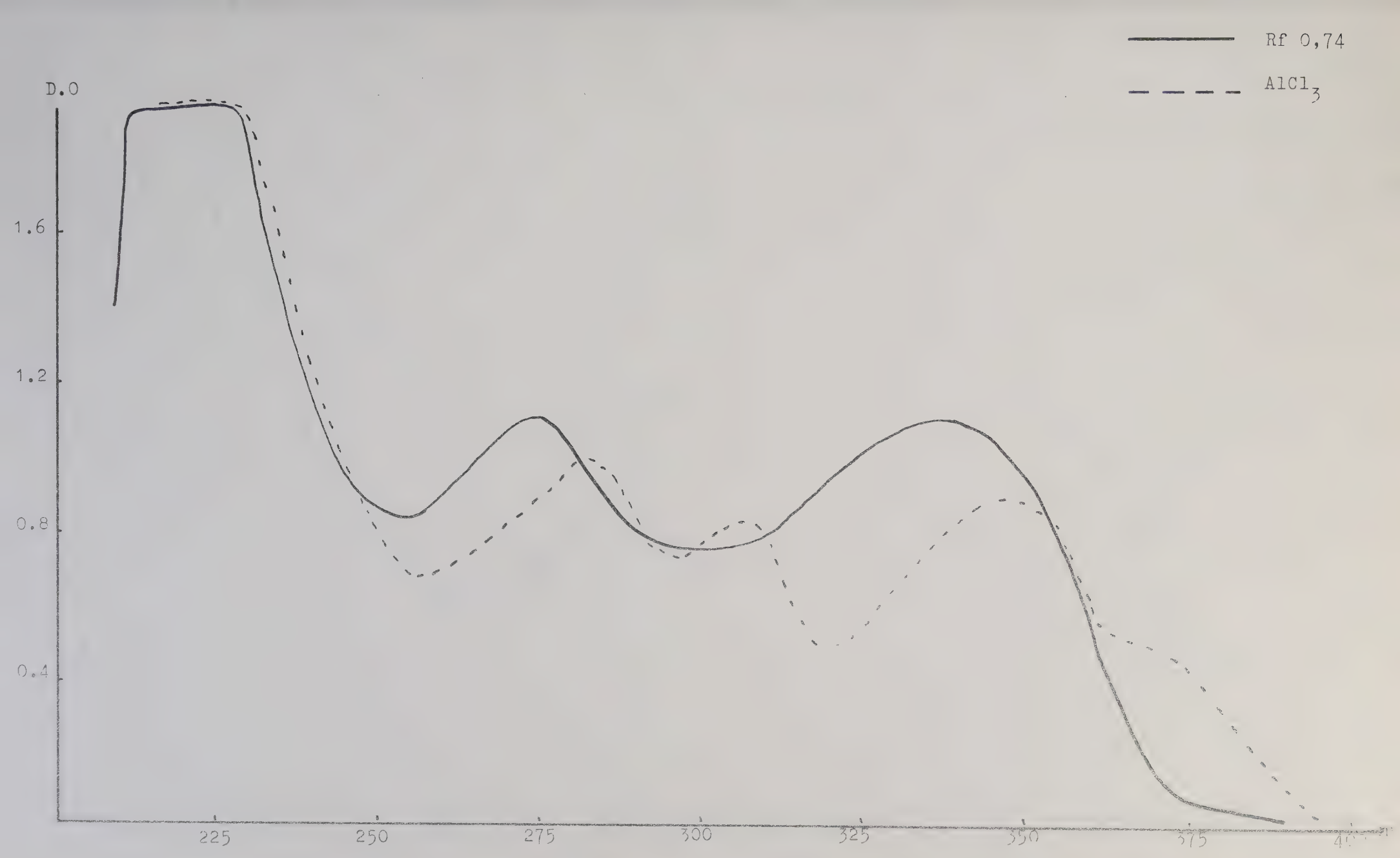
Par ailleurs, la courbe est typique de l'apigénine. On sait par la chromatographie et les essais d'hydrolyse qu'il s'agit de C-glycoside, ce produit est donc de type violanthine ou vicénine non encore connu dans les Cesalpiniées. La structure exacte de ces corps est très difficile à élucider et nécessite l'étude en résonance magnétique nucléaire (R.M.N.).

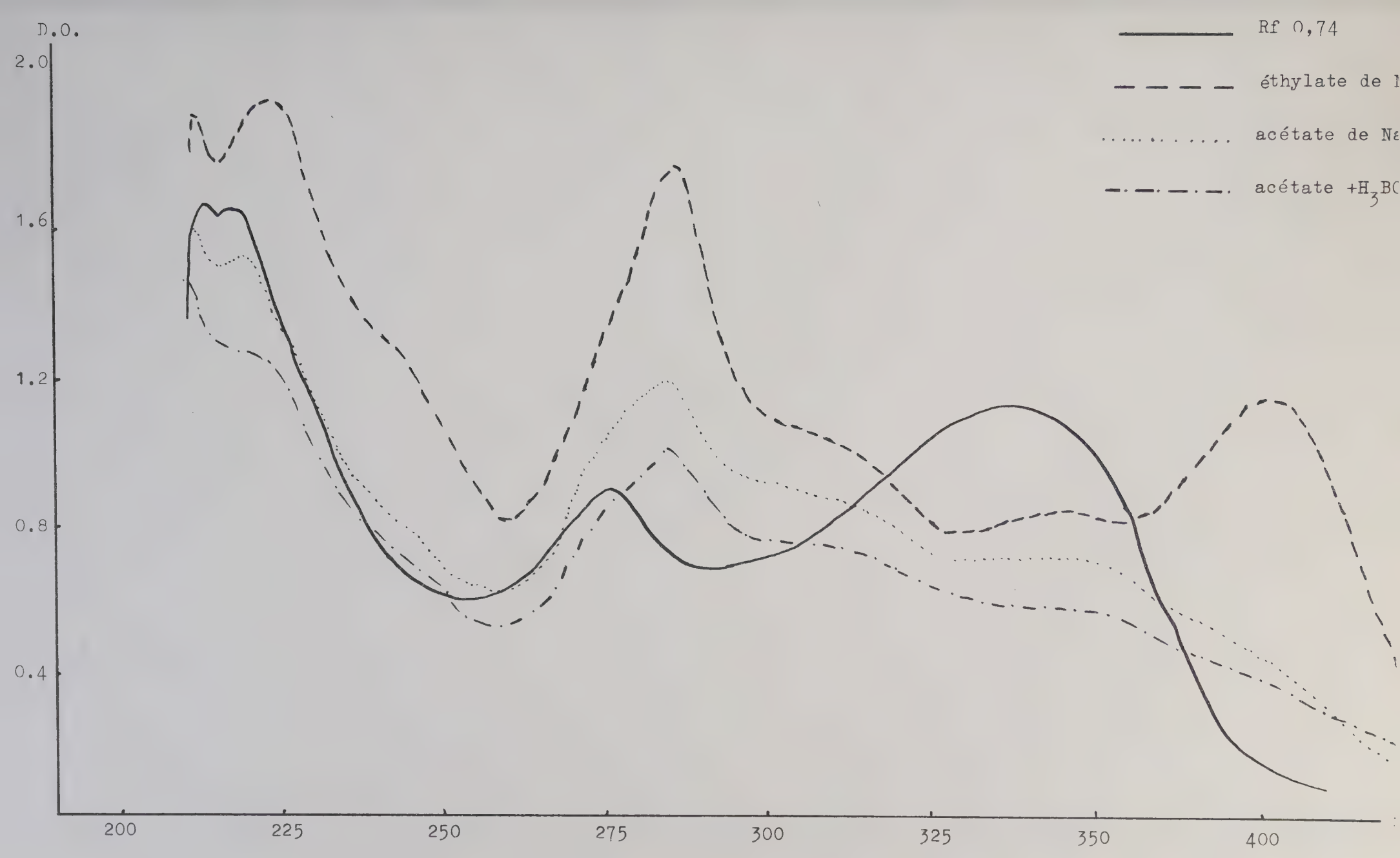
Les flavones lutéoline et apigénine sont présentes fréquemment dans les Légumineuses sous forme de 7-glycosides, exceptionnellement sous forme de 5-glycosides. Mais les 5-glycosides se reconnaissent bien en chromatographie à leur fluorescence bleue.

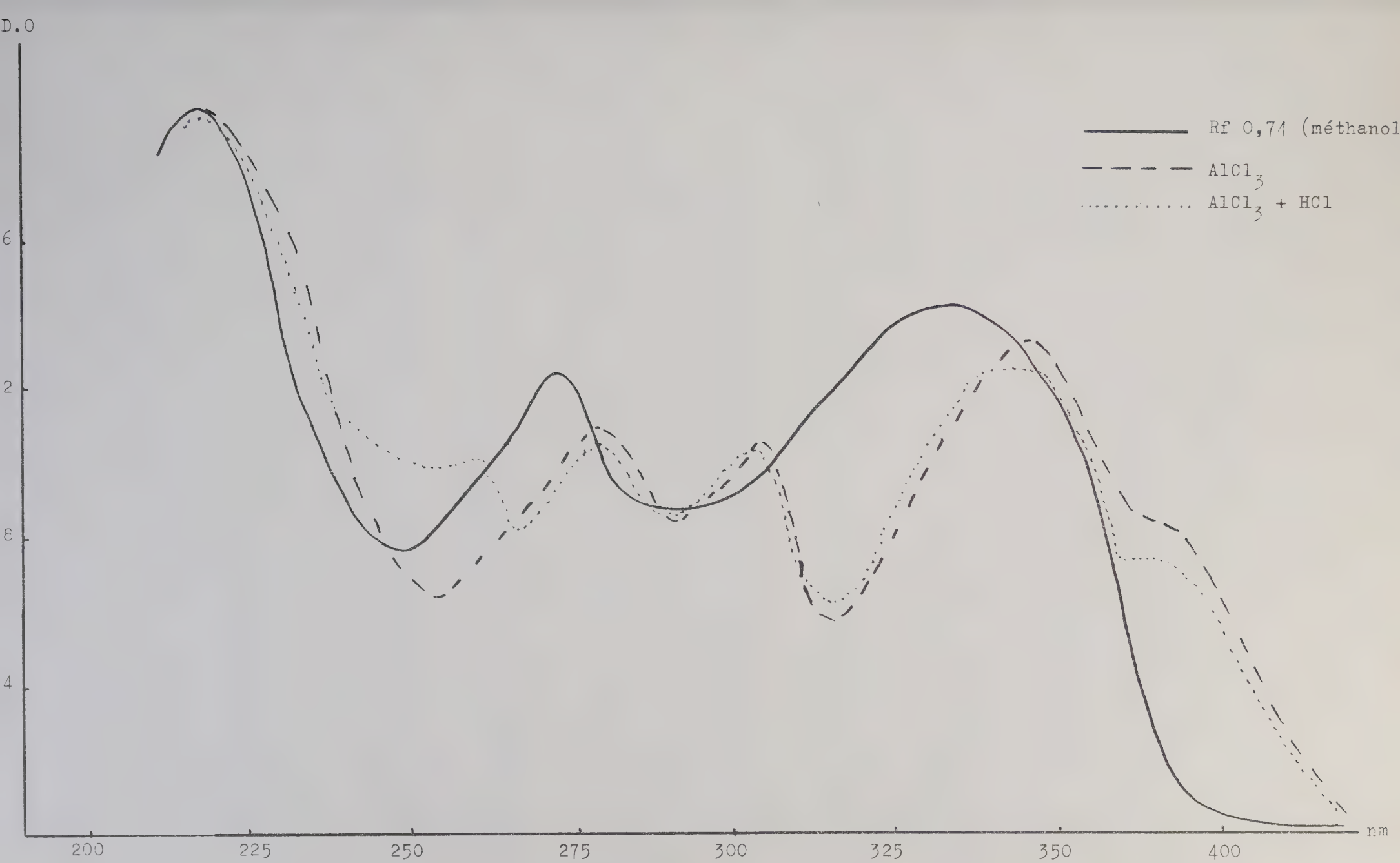
Les C-glycosides d'apigénine et de lutéoline sont également assez fréquents dans les légumineuses parfois sous forme de méthyl éther (scoparoside).

Des glycoflavones sont connues dans les graines de certaines espèces du genre Crotalaria (1).

(1) HARBORNE (J.B.), BOULTER (D.), and TURNER (B.L.) Chemotaxonomy of the Leguminosae, Academic Press London and N.Y. 1971.


Rf 0,74
AlCl3
D.O
1.6
1.2
0.8
0.4
225
250
275
300
325
350
375


D.O.
2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
200
225
250
275
300
325
350
400
Rf 0,74
éthylate de
acétate de Na
acétate +H3BO


D.O
6
2
ε
4
Rf 0,71 (méthanol
AlCl3
AlCl3 + HCl
200
225
250
275
300
325
350
400
nm

D) - ETUDE DE LA SUBSTANCE X.-

En observant le tableau II de ce travail, il apparaît que 5 Cassia seulement sont cités comme possédant des alcaloïdes.
HARBORNE (1) relève :
. la cassine de Cassia carnaval et de Cassia excelsa
. la carnavaline de Cassia carnaval
. la chaksine de Cassia absus,
tous trois de structure connue. De plus, sont citées, la cassilysine et la cassilysidine de Cassia excelsa, dont les structures sont inconnues.

Nous avons vu plus haut la formule proposée pour la chaksine ainsi que sa structure.

La substance "X" isolée est soluble en milieu acide et alcalin ; elle se présente sous la forme d'une poudre blanche insoluble dans l'eau, l'alcool absolu, le méthanol et les solvants organiques. Seul l'alcool dilué (60^c, 70^c) à chaud semble la dissoudre. La réaction de la cyanidine est négative, et il n'y a pas de réduction de la liqueur de FEHLING. Les réactifs généraux des alcaloïdes donnent une réaction fortement positive.

La chromatographie en couches minces dans les systèmes déjà cités pour les flavones ne donne aucun résultat.

Nous avons donc pensé qu'il ne s'agissait pas d'un polyphénol mais d'une autre substance, alcaloïde ou amino acide, extractible par l'alcool à 80^c mais précipitant dans l'alcool absolu.

(1) HARBORNE (J.B.), BOULTER (D.) and TURNER (B.L.) op. cit. p. 69.

Nous avons alors essayé les solvants suivants en couches minces de gel de silice G, (Merck).

Solvant I - chloroforme - diéthylamine - (5-5) (1)
Solvant II - chloroforme - cyclohexane - diéthylamine - (4-5-1) (1)
Solvant III - chloroforme - éthanol - (9-1) (2)
Solvant IV - n. butanol - acide acétique - eau - (6-1-2) (3)

Révélateur : Réactif de DRAGGENDORF.

Ce sont des solvants de migration des alcaloïdes et bases aminées. Nous avons pris comme témoin de migration, le chlorhydrate d'hyosciamine. Seul le solvant IV révèle une tâche orangée de Rf 0,48. Néanmoins, le dépôt dans les autres systèmes est toujours orangé.

Il semble bien que nous soyons en présence d'un alcaloïde ou d'une base aminée. Nous avons alors orienté nos recherches sur l'identification de cette substance par les mesures suivantes :

1 - Analyse élémentaire
2 - Spectrométrie de masse
3 - Spectrophotométrie Infrarouge
4 - Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (R.M.N.)

- L'analyse élémentaire donne les pourcentages suivants :
  C = 44,72
  H = 6,77 - 6,79 - 6,75
  N = 14,19 - 14,22 - 14,18.
  O (par différence) = 34,31

(1) WALDI (D.), SCHNAKERZ (K.), MUNTER (F.), J. Chromatography 1961, 6, 61.
(2) TEICHERT (K.) Deutsch. Apotheker Ztg, 1960, 100, 477.
(3) STAHL (E.) op. cit. p. 36

- La masse du produit acétylé mesurée par spectrométrie de masse est de 619.
  Le spectre indique une perte de CH_3 (-15), deux pertes de fonction amide (-42) mais pas de perte d'acétyl , ce qui semble signifier que l'acétylation réalisée conduit à des amides, donc se fait sur des fonctions amines libres. Certains fragments (-168) sont difficilement interprétables et nécessitent des études ultérieures.

- Le spectre infrarouge du produit non acétylé montre surtout la présence d'OH ou d'amines (3300 - 3350), de CH - alcanes (2910) et de carbonyl-conjugué (1675 - 1725).

  Compte tenu de la masse du produit acétylé, les pourcentages fournis par l'analyse élémentaire pourraient correspondre aux formules suivantes :

  $(C_7 H_{12 \text{ à } 14} N_2 O_4)_n$ ou bien $(C_{11} H_{19} N_3 O_6)_{n'}$

- Le spectre de R.M.N. enregistré dans le deutério-chloroforme peut permettre de supposer qu'il s'agit d'un composé aromatique, mais les difficultés de solubilisation rencontrées n'ont pu permettre d'obtenir plus de précisions.

  Ce que l'on peut conclure, c'est que cette substance n'a pas les caractère indiqués par la littérature pour la chaksine et l'isochaksine déjà connus dans Cassia absus, non plus que ceux de la cassine ou de la cassilydine de Cassia carnaval et Cassia excelsa.
  Ce corps est donc original. Nous proposons de le nommer "abnaline".

  Par ailleurs, nous avons essayé d'isoler les alcaloïdes de Cassia absus sous forme d'iodure par une méthode classique de séparation des bases quaternaires (1) :

(1) CUBUKCU (B.) Pl. Med. et Phytothérapie 1968, 2, (4), 272-80.

Après extraction et action d'une solution saturée d'iodure de potassium, on obtient un précipité cristallisé dans le méthanol.

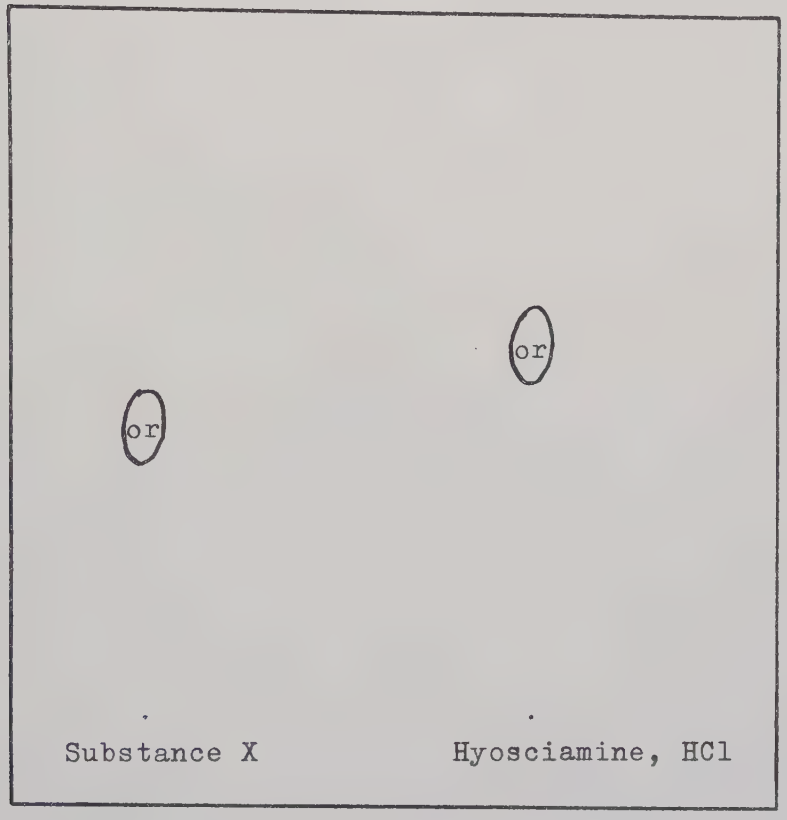
Sa chromatographie dans le système IV fournit à la révélation par le réactif de DRAGGENDORF 4 tâches principales. A côté donc de la chaksine et de l'isochaksine, il reste à étudier 2 autres substances alcaloïdique non encore signalées dans la littérature.

- Chromatographie en couches minces de la substance X en présence d'un alcaloïde pris comme témoin de migration.-

Support : gel de silice G

Solvant : n. butanol - acide acétique - eau - (6-1-2)

Révélateur : Réactif de DRAGGENDORF



Cette étude malheureusement trop sommaire nous a permis de mettre en évidence la présence de sept acides phénols identifiés, l'existence de deux flavones C-glycosylées, ceci dans le domaine des polyphénols, dont aucune étude n'a été faite jusqu'à présent dans cette espèce.

D'autre part, des substances alcaloïdiques inconnues dont l'une, bien distincte, par ses constantes physiques, de la chaksine, reste à étudier du point de vue chimique comme du point de vue pharmacologique. Les caractères spectraux de l'"abnaline" ainsi que sa masse (spectre de masse du produit acétylé) montrent qu'il s'agit d'une base aminée aromatique fortement oxygénée, fait nouveau par rapport à la littérature concernant les alcaloïdes des Cassia.

E) - ETUDE DE L'INSAPONIFIABLE.-

1. Extraction
2. Recherche des constituants
3. Saponification
4. Chromatographie des stérols

   a) Chromatographie sur colonne d'alumine
   b) Chromatographie en couches minces

5. Etude spectrale des caroténoïdes

1. Extraction.-

Lors de l'essai d'isolement des flavonoïdes, nous avons préalablement dégraissé les graines par lixiviation à l'éther de pétrole avec un rendement de 6 % d'extrait pétroléïque. Ceci est du même ordre de grandeur que le pourcentage trouvé par JOHNSON déjà cité (7,5 %).

- Aspect et solubilité :

Cet extrait se présente sous la forme d'une huile jaune, soluble dans le méthanol et le chloroforme.

2. Recherche des constituants.-

La recherche des alcaloïdes sur le résidu sec repris par de l'acide chlorhydrique N et celle des polyphénols se sont révélées négatives.

La réaction de LIEBERMANN caractéristique des stéroïdes, effectuée sur une solution chloroformique se révèle fortement positive. On observe une coloration bleu vert intense.

3. Saponification.-

Une prise d'essai de 10 g d'extrait à l'éther de pétrole est placée dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux (1). On ajoute 100 cm3 de solution alcoolique d'hydroxyde de potassium à 5 %. On porte au bain-marie pendant 2 heures. Après refroidissement, on extrait par trois fois 100 cm3 d'éther éthylique.

(1) Pharmacopée française, 8è édition, Paris, 1965.

Les solutions éthérées sont réunies, lavées successivement avec de l'eau additionnée de quelques gouttes d'acide chlorhydrique, puis avec une solution à 3 % d'hydroxyde de potassium et enfin avec de l'eau distillée jusqu'à l'absence de réaction à la phénolphtaléine. La solution ainsi lavée est mise à évaporer dans un cristallisoir taré et la dessiccation est complétée à l'étuve à 100-105°c pendant 30 minutes. Le rendement en insaponifiable est de 7,5 %. La coloration de l'extrait nous a fait penser à la présence possible de caroténoïdes non encore signalés dans la littérature.

Sur cet extrait la réaction de CARR et PRICE est positive de même que la réaction de LIEBERMANN (caroténoïdes, stérols).

. Séparation fractionnée :

Elle nous a permis d'obtenir 3 fractions cristallisées blanches à réactio de LIEBERMANN positive.

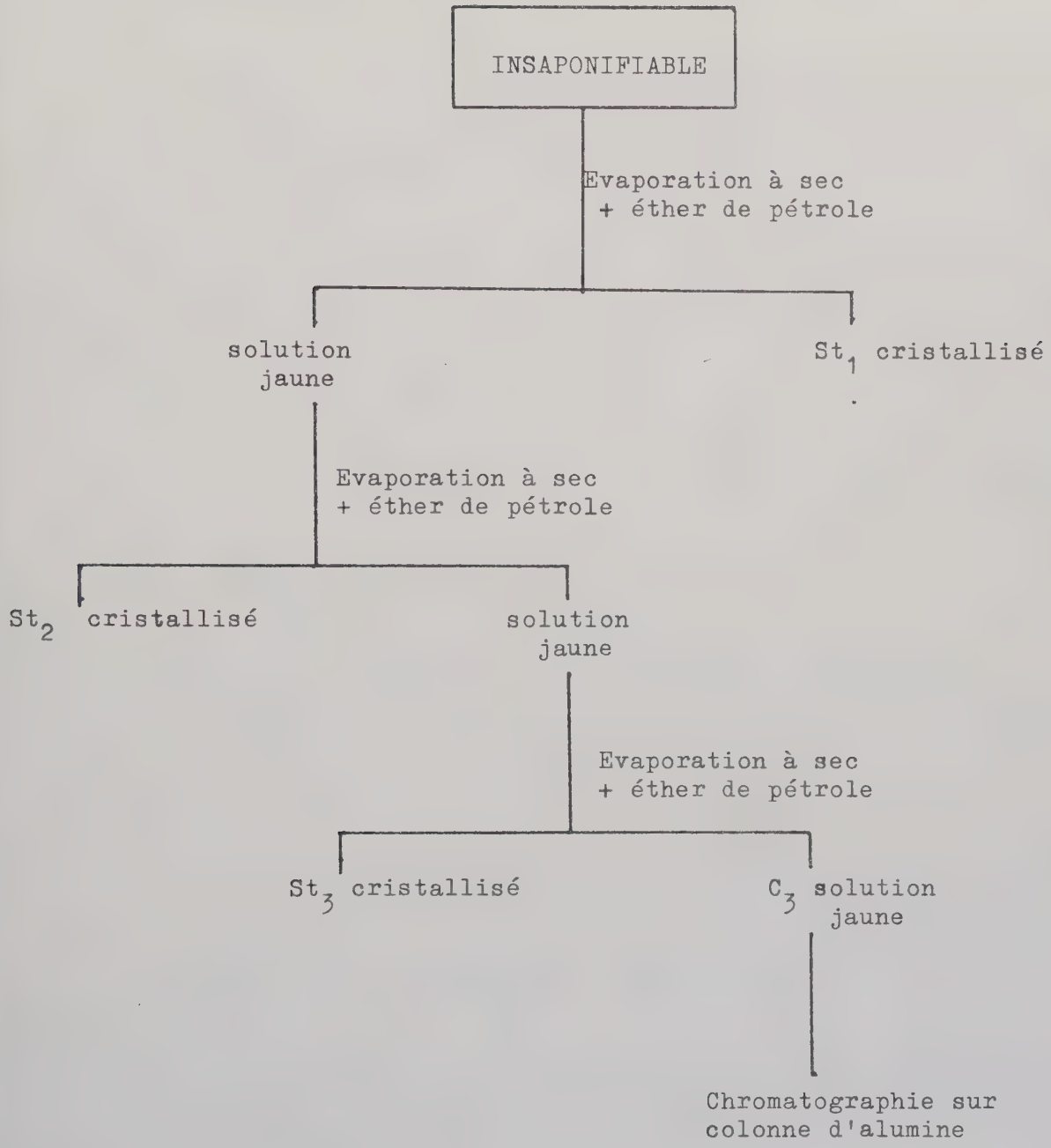


Figure 3 - Schéma de fractionnement des stérols.-

4. Chromatographie des stérols.-

a) Chromatographie sur colonne d'alumine.-

On utilise une colonne de 30 cm de longueur et de 2 cm de diamètre, remplie d'alumine neutre Woelm (Activité II) mouillée à l'hexane. La solution C_3 est, après évaporation à sec, remise en solution dans le même solvant.

L'élution est réalisée de la façon suivante :

Fractions recueillies (45 cm3)	Solvant	
1 - 4	Hexane	
5 - 8	Hexane - éther éthylique	9 : 1
9 - 12	" "	8 : 2
13 - 16	" "	7 : 3
17 - 22	" "	5 : 5
23 - 26	" "	2 : 8
27 - 32	éther éthylique	
33 - 37	éther éthylique - acétone	5 : 5
38 - 42	acétone	

Les fractions recueillies sont évaporées à sec et reprises par 2 cm3 d'hexane pour examen en chromatographie en couches minces. Auparavant une orientation peut être donnée par la couleur des extraits et les réactions de LIEBERMANN et CARR et PRICE.

Les fractions les plus riches en stérols et carotènes (coloration orangée et réactions d'identification fortement positives) sont les fractions 35 et 36.

Nous les étudierons plus particulièrement avec les fractions St_1, St_2, St_3 déjà obtenues par cristallisation fractionnée.

Lors de la reprise par l'hexane des extraits évaporés à sec, on observe dans les fractions 35 et 36 une cristallisation spontanée.

Plusieurs cristallisations fractionnées nous permettent d'obtenir :

- deux fractions cristallisées St_{35} et St_{36}
- deux solutions orangées C_{35} et C_{36}.

b) Chromatographie en couches minces.-

Nous avons utilisé comme support un mélange de gels de silice H et G (44 : 10) étalé à l'aide d'une solution aqueuse de nitrate d'argent à 1,26 % (1).

Cette technique permet une meilleure séparation des corps de structure très proche par l'augmentation du degré de résolution en fonction des doubles liaisons.

Solvants :

I - pentane - éther éthylique - 70-30
II - pentane - éther éthylique - 50-50
III - pentane - acétate d'éthyle - acétone - 18-4-1 (2)

Révélateurs :

- trichlorure d'antimoine à 15 % dans le chloroforme.
- acide sulfurique R.P. au 1/2
- acide orthophosphorique (85 %, d = 1,70) puis acide phosphomolybdique (1,5 % p/v dans l'éthanol).

Chauffage 10 minutes à 105°c pour les 3 révélateurs.

Les chromatographies ont été effectuées en présence de témoins : β-sitostérol et stigmastérol.
La comparaison des Rf est difficile à interpréter.
Les stérols témoins : β-sitostérol et stigmastérol migrent au même niveau dans les 3 solvants. Le tableau suivant est à ce point significatif

(1) EL. IDRISSI (T.) Thès. Doct. Univ. Pharm. Grenoble, 1971, 27, n° 5.
(2) ANTONIO (A.), DEVYS (M.), PINTE (F.), BARBIER (M.), C.R. Acad. Sc. Paris, 1970, 271, 862-5.

TABLEAU XIII

	β-sito-stérol	stigma-stérol	St_1	St_2	St_3	St_{35}	St_{36}	C_{35}	C_{36}
Solvant I	0,26	0,26	0,25	0,25	0,25	0,25	0,26	0,24* 0,31 0,36*	0,24* 0,30 0,36*
Solvant II	0,65	0,65	0,67	0,67	0,67	0,66	0,66	0,65 0,74* 0,80*	0,66 0,75* 0,81*
Solvant III	0,81	0,81	0,80	0,80	0,80	0,80	0,81	0,79 0,87* 0,95*	0,80 0,87* 0,95*

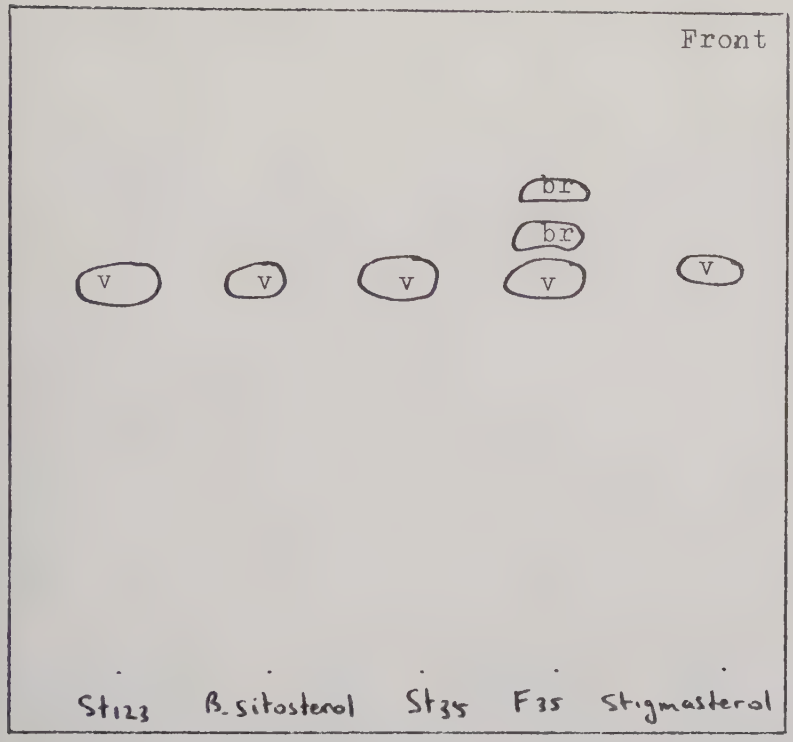
(*) tâches révélées en brun orangé.

Les fractions St_1, St_2 et St_3 ayant les mêmes Rf dans les 3 solvants ont été réunies en une fraction St_{123}.

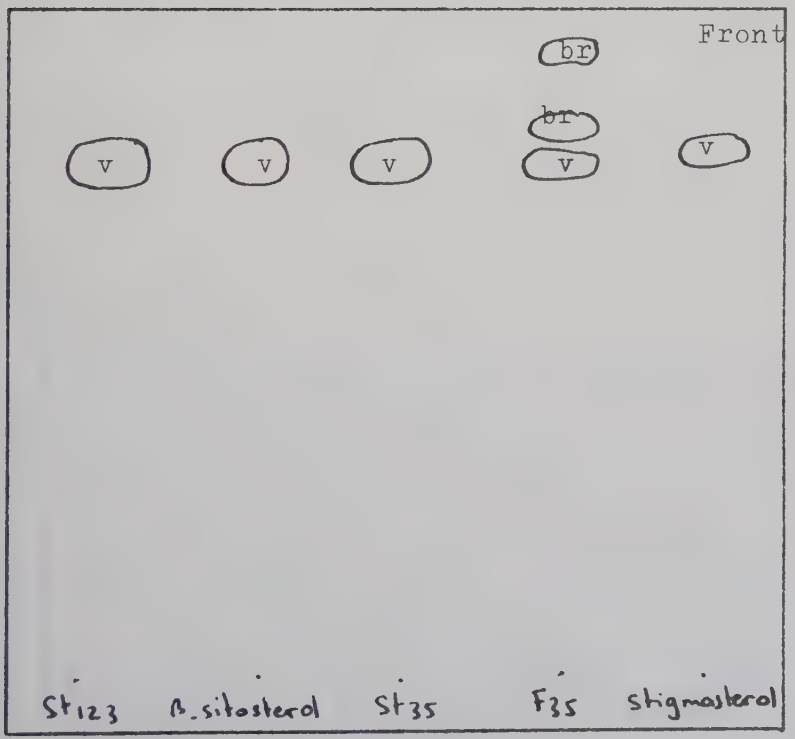
Cette dernière ainsi que les fractions St_{35} et St_{36} ont été examinées plus en détail par les mesures suivantes :

- Point de fusion
- Spectre infrarouge
- Chromatographie en phase gazeuse.

- Chromatographie en couches minces des stérols.-

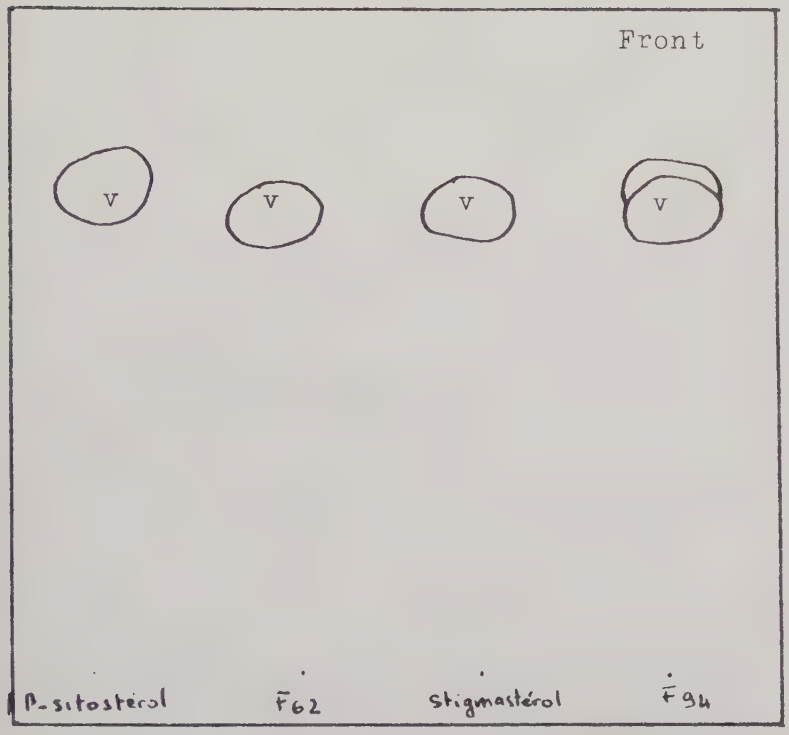


Support : silicagel G + $AgNO_3$
Solvant : pentane - éther - (50-50)
Révélateur : H_2SO_4 au 1/2



Support : silicagel G + $AgNO_3$
Solvant : pentane - acétate d'éthyle - acétone (18-4-1
Révélateur : H_2SO_4 au 1/2

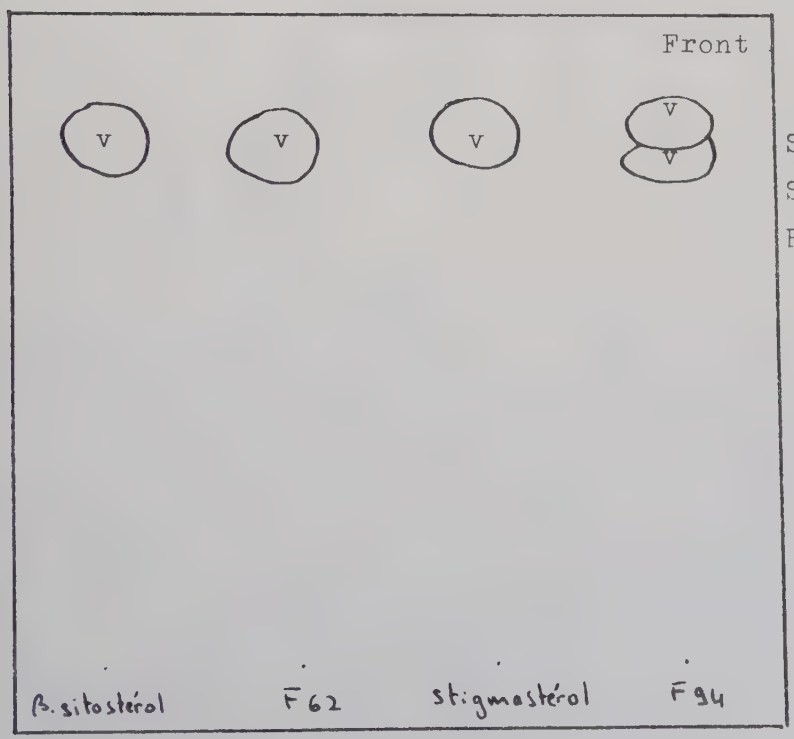
- Chromatographie en couches minces des stérols.-



Support : silicagel G + $AgNO_3$

Solvant : pentane - acétate d'éthyle - acétone (18-4-1)

Révélateur : H_3PO_4 + acide phosphomolybdique



Support : silicagel G + $AgNO_3$

Solvant : pentane - éther (80-20)

Révélateur : H_3PO_4 + acide phosphomolybdique.

- Point de fusion

Mesuré à l'appareil Mettler FP_1 à lecture automatique.

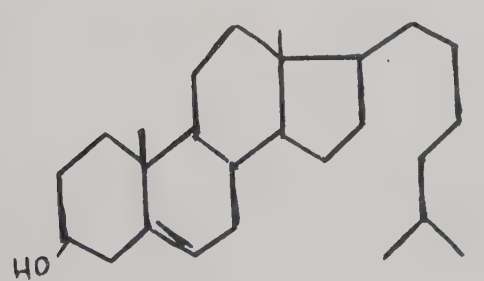
β-sitostérol	stigmastérol	St_{123}	St_{35}	St_{36}
138°C - 140°C	170°C	135,6°C	133,2°C	133,8°C

Le point de fusion de chacune des fractions additionnée d'un stérol témoin est très nettement abaissé, les fractions isolées ne sont donc pas pures.

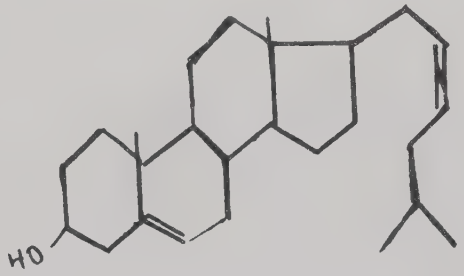
- Spectre infrarouge

Les spectres ont été examinés sur l'appareil Unicam SP 1200 en pastille de K Br (*).

On trace en parallèle les spectres des stérols témoins. Les 2 molécules diffèrent par la double liaison en 19-20 qui existe dans le stigmastérol et est absente dans le β-sitostérol.



β-sitostérol

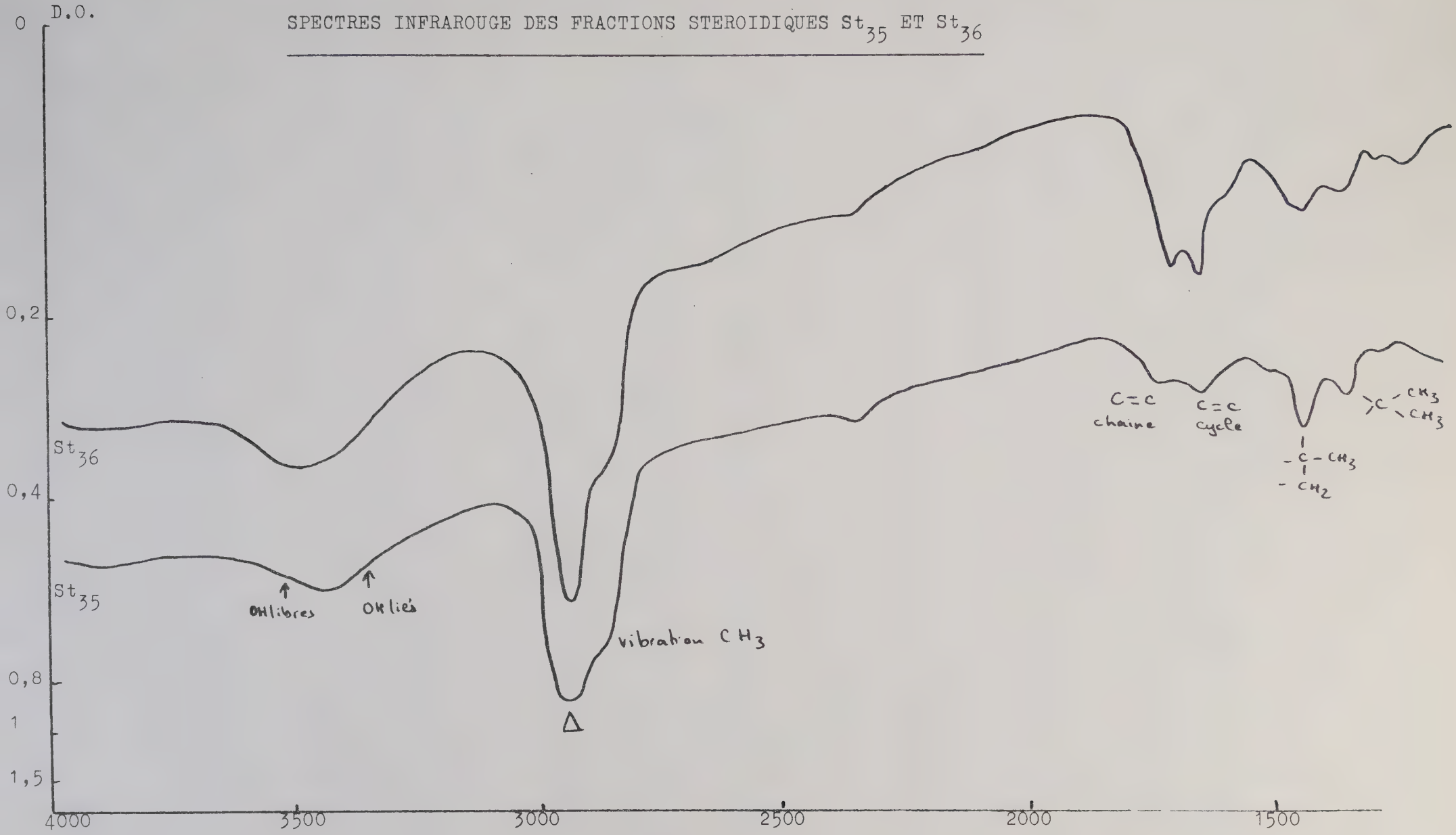


stigmastérol

Il est assez curieux de constater que l'on retrouve des éléments caractéristiques de ces 2 stérols sur les différents spectres : double liaison en 19-20 du stigmastérol à 950-960 cm^{-1}.

(*) Je tiens ici à remercier Mademoiselle le Professeur ALARY qui a bien voulu tracer ces spectres et nous a donné de précieuses indications pour leur interprétation.

SPECTRES INFRAROUGE DES FRACTIONS STEROIDIQUES St_{35} ET St_{36}



- Chromatographie en phase gazeuse

Le travail de Madame CONREUR (1) sur les stéroïdes des Apocynacées, nous a fait penser que la C.P.G. permettrait de préciser ce que nous supposions déjà, mais que nous n'avions pu mettre en évidence avec les méthodes déjà utilisées.

La partie expérimentale a été réalisée au Laboratoire d'Hormonologie du C.H.R. de La Tronche (*).

Conditions opératoires :

Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe CARLO ERBA G.N., simultanément sur 2 colonnes de 3 mètres :
- colonne 1 : support : G.C.P. 100-120 mesh à 1 % OV1
- colonne 2 : support : G.C.P. 100-120 mesh à 1 % OV17

OV17 donne à la colonne une polarité plus grande, sa rétention est plus importante que celle de la première et les pics sont plus nettement séparés.
Le détecteur est à ionisation de flamme et on maintient une température constante de 255°C. Le débit d'azote est de 40 ml/minute. La vitesse de déroulement du papier est de 30,5 cm/heure.
Les échantillons sont examinés après transformation en esters triméthysilylés (T.M.S.) par estérification de l'hydroxyle en 3.

Silylation :

1 mg de cristaux à analyser est mis en solution dans la pyridine anhydre. Après addition de 0,1 cm3 de N.O. bis (triméthylsilyl) - trifluoroacétamide (B.S.T.F.A.) puis de 0,1 cm3 de triméthylchlorosilane, on chauffe 10 minutes à 37°C. Sur un banc de sable chauffé à 60°C, on évapore à sec en présence d'azote.

(1) CONREUR (C.) Thèse Univ. Paris XI, Fac. Sci. Orsay, 1971.
(*) Monsieur le Professeur CHAMBAZ a bien voulu mettre à notre disposition son équipement et nous a guidé dans l'interprétation des résultats.

Après refroidissement, on ajoute 1 cm3 de chloroforme anhydre. La solution ainsi obtenue est agitée vigoureusement puis laissée au repos quelques minutes.
Les injections d'esters TMS sont de 2 µl.

Les résultats sont réunis dans les tableaux suivants : les pics indiquent la distance de rétention (Dr) en centimètres :

TABLEAU XIV - Colonne 1 (OV1)

Dr Esters TMS	Pic A	Pic C	Pic B
β-sitostérol		(7,3)	8,9
stigmastérol		7,78	
St_{123}	6,95	7,5	8,64
St_{35}	6,91	7,48	8,6
St_{36}	6,9	7,4	8,6

TABLEAU XV - Colonne 2 (OV17)

Dr Esters TMS	Pic A	Pic C	Pic B	Pic D
β-sitostérol	8,6		10,9	
stigmastérol		9,5		
St_{123}	8,55	9,3	10,8	11,85
St_{36}	8,65	9,4	10,9	11,88

Vitesse de déroulement du papier : 30,5 cm/heure.

Il semble, d'après ces résultats que nous soyons en présence de mélanges de sitostérol et de stigmastérol (Pics 9,5 et 10,9 sur la colonne 2 (OV17)) et certainement d'un ou plusieurs autres corps car on observe dans les 3 fractions un pic à distance de rétention plus courte : 6,5 sur la colonne 1 et un autre à 11,85 sur la colonne 2.

Au vu des chromatographies et des différents spectres nous pouvons dire que les fractions étudiées : St_{123}, St_{35} et St_{36} sont des mélanges de plusieurs corps. Néanmoins, le β-sitostérol est prédominant dans les fractions St_{123} et St_{35} alors que la fraction St_{36} est plus riche en stigmastérol.

Afin de préciser ces hypothèses, nous avons réalisé une deuxième extraction du même type à partir de 25 grammes d'huile obtenue par extraction au soxhlet. On obtient 1,6 g d'insaponifiable (6,4 %) qui est chromatographié sur colonne d'alumine. L'élution se veut ici plus sélective afin de tenter d'obtenir des fractions pures. Nous verrons que cela a été impossible, les stérols présents étant très proches les uns des autres.

Cette élution est réalisée de la manière suivante :

Fractions (30 cm3)	Solvant	
1 - 9	Hexane	
10 - 13	Hexane - éther	95 : 5
14 - 16	" "	90 : 10
17 - 24	" "	85 : 15
25 - 34	" "	80 : 20
35 - 43	" "	75 : 25
44 - 49	" "	70 : 30
50 - 54	" "	50 : 50
55 - 63	" "	30 : 70
64 - 70	" "	20 : 80
71 - 78	" "	10 : 90
79 - 87	éther	
88 - 95	éther-acétone	70 : 30
96 - 103	" "	50 : 50
104 - 107	" "	30 : 70
108 - 122	acétone	

La réaction de LIEBERMANN et la chromatographie en couches minces dans les systèmes déjà utilisés permettent de retenir 3 fractions les plus riches en stéroïdes : 62, 91, 94.

Elles sont alors passées en chromatographie en phase gazeuse sous forme d'esters TMS avec le même matériel que précédemment. Seule la température est changée et est maintenue constante à 280°C. La fraction 62 paraît presque exclusivement composée de β-sitostérol.

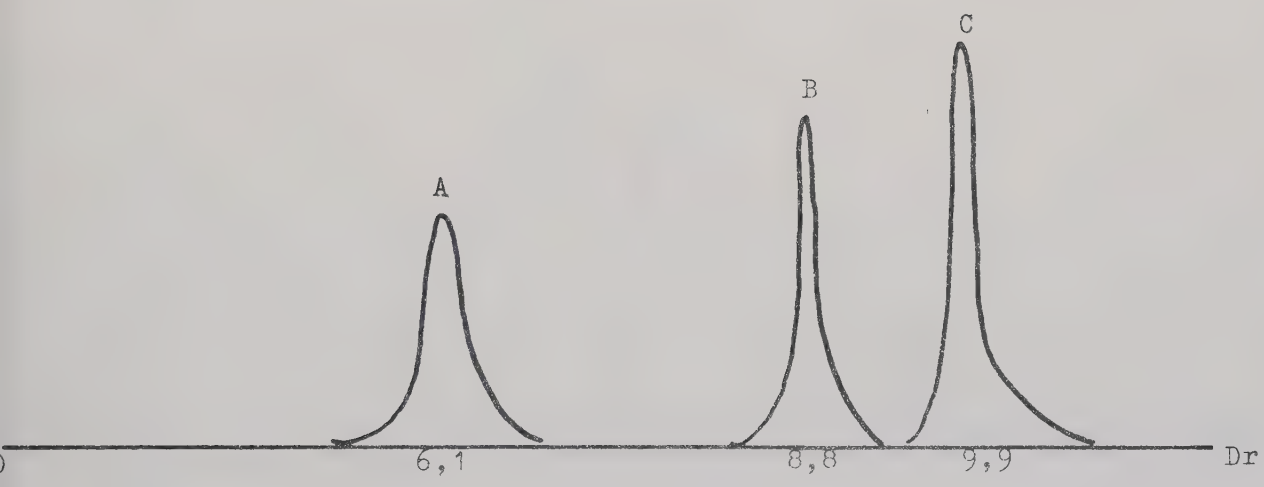
La fraction 91 est un mélange de β-sitostérol, stigmastérol, et cholestérol.

Il en est de même de la fraction 94 dans un rapport de 3 : 1 : 0,25.

Nous pouvons ainsi confirmer la présence de β-sitostérol déjà signalée et celles encore inconnues de stigmastérol et de cholestérol.

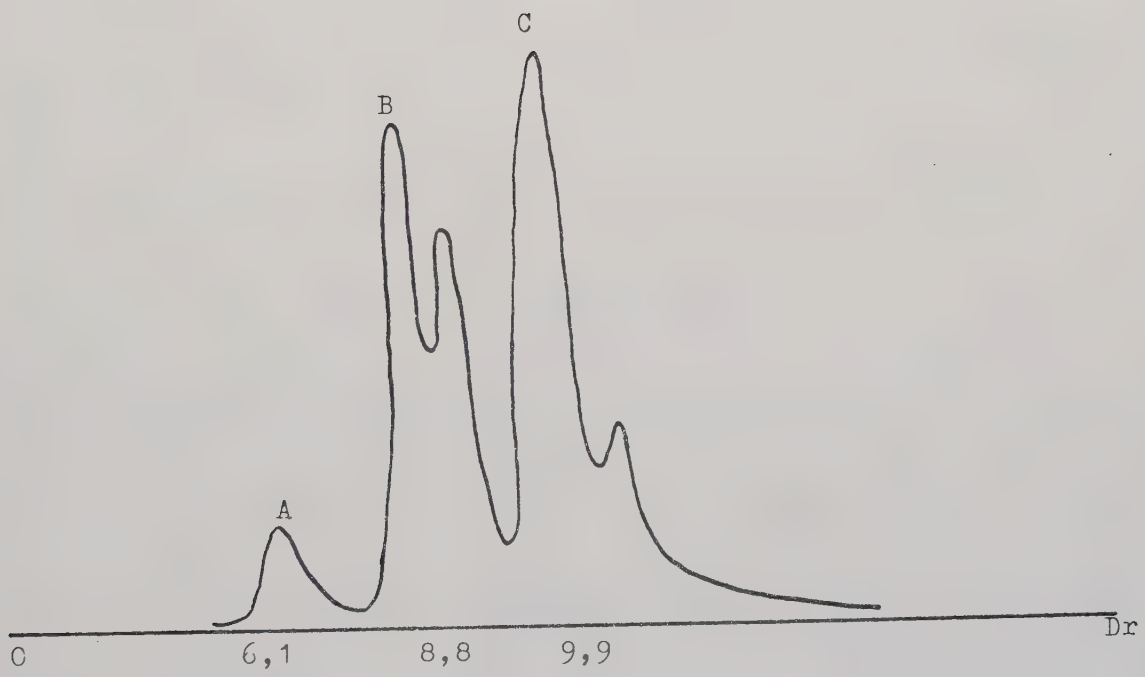
- Chromatographie en phase gazeuse des stérols témoins.-

A - CHOLESTEROL
B - STIGMASTEROL
C - β-SITOSTEROL



Colonne : G.C.P. 100-120 mesh à 1 % OV17
température : 280°C
Injection : 2 µl d'esters T.M.S.
Vitesse de déroulement du papier : 30,5 cm/heure.

- Chromatographie en phase gazeuse de l'extrait St_{94}.-



Colonne : G.C.P. 100-120 mesh à 1 % OV17
température : 280°C
Injection : 2µl d'esters T.M.S.
Vitesse de déroulement du papier : 30,5 cm/heure.

5. Etude spectrale des caroténoïdes.-

Nous basant sur les travaux de GODWIN (1), FIASSON (2) et ARPIN (3) nous avons traité l'insaponifiable par l'acétone aqueux à 20 % afin de tracer un spectre ultraviolet.

Les fractions orangées obtenues par chromatographie sur colonne ne donnent pas de résidus suffisamment importants.

Le spectre d'absorption d'un caroténoïde à cycle aromatique présente trois pics caractéristiques dans l'ultraviolet ou le visible. Le pic médian possédant la plus forte intensité optique permet la différenciatio des molécules. L'emploi de plusieurs solvants aide également à leur caractérisation.

Les résultats sont exposés dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU XVI

	éther de pétrole	benzène	chloroforme
γ carotène	437.462.494	447.477.510	447.475.508
β carotène	425.451.482	466	466.497
ε carotène	419.444.474	434.452.487	433.452.483
δ carotène	428.458.490	445.467.501	440.470.503
Valeurs trouvées	425.450.480	435.460.489	438.463.491

Les valeurs théoriques sont données par ARPIN (4)

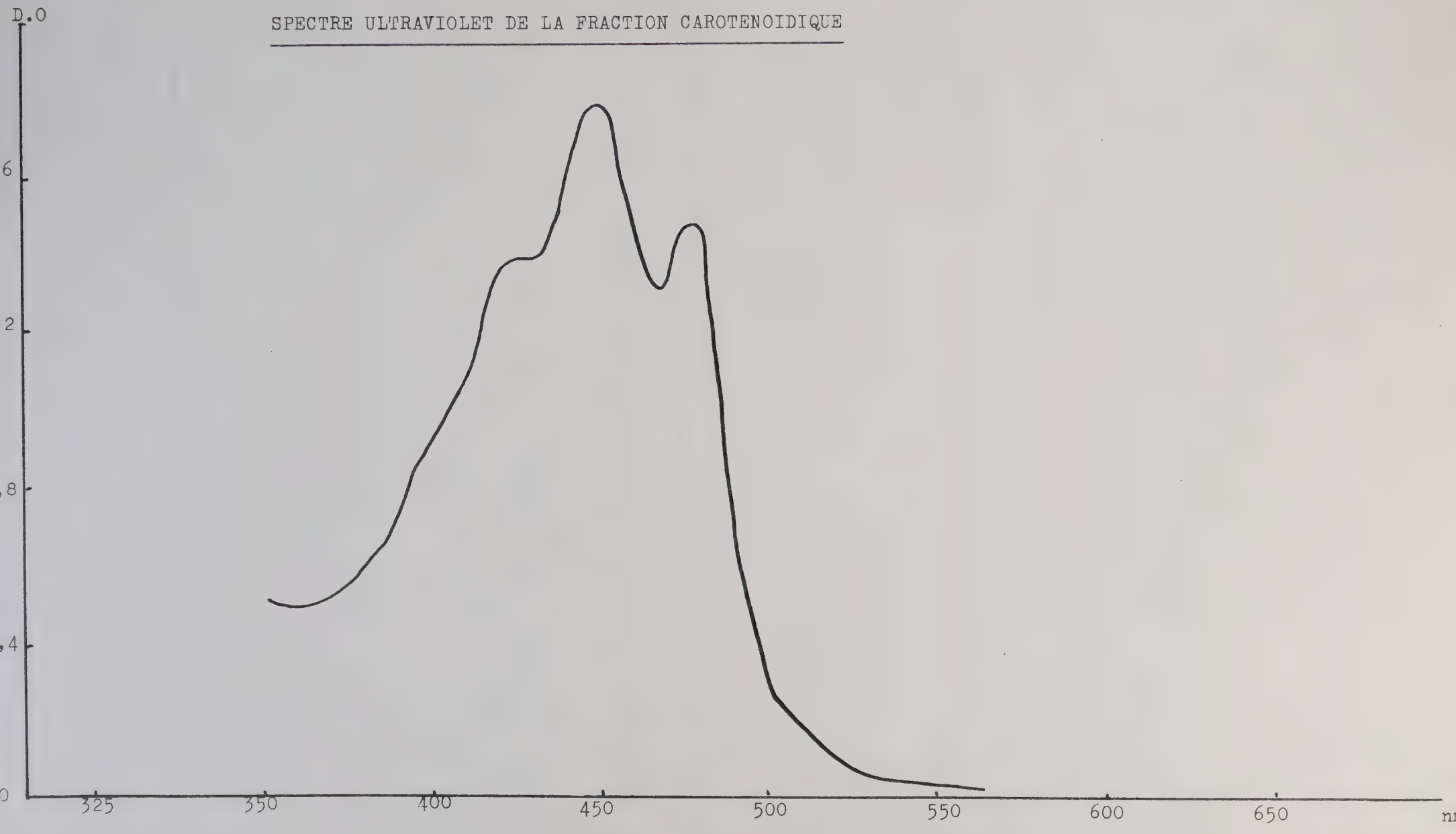
(1) GODWIN (T.W.) Carotenoïds in PAECH (K.), TRACEY (M.V.) Modern Methods o Plant analysis, Berlin, Springer Verlag, 1955, 3, 272-312.

(2) FIASSON (J.L.) Thès. Sci. Lyon, 1968 n° 362.

(3) ARPIN (N.), FIASSON (J.L.), LEBRETON (Ph.) Bull. Soc. Nat. Arch. Ain 1968, 82, 47.

(4) ARPIN (N.) Thès. Sci. Lyon 1968, n° 527.

SPECTRE ULTRAVIOLET DE LA FRACTION CAROTENOIDIQUE



Conclusion de l'étude chimique.-

Nous ne pouvons confirmer la présence d'une toxalbumine dans l'échantillon étudié. La fraction protéique que nous avons extraite ne provoque pas la mort des animaux, ni d'ailleurs, la poudre de graines absorbée par eux aux lieu et place du régime habituel. Aucune action mitogénique ni hémagglutinante n'a été observée. Un certain nombre d'acides aminés libres ont été identifiés.

Le mucilage isolé est un galactomannane lié à des acides uroniques, et nous verrons dans la dernière partie de ce travail, ses propriétés technologiques.

En ce qui concerne les polyphénols, nous avons mis en évidence la présence de sept acides phénols dans l'extrait éthéré, substances qui ont été identifiées. La présence de deux C-glycosides de flavones a été prouvée. Leur étude reste à faire.

Une substance de nature alcaloïdique différente des alcaloïdes de Cassia déjà connus a été isolée et son étude se poursuit.

Deux stérols, stigmastérol et cholestérol sont venus s'ajouter au β-sitostérol déjà signalé.

Enfin, la graine renferme des caroténoïdes assez abondants. Il paraît probable que la présence de tous ces éléments combinés donne à la graine les propriétés thérapeutiques qui lui sont attribuées, en particulier l'activité antiulcéreuse et cicatrisante.

On connaît en effet l'action trophique pour la peau des stérols, ainsi que plus récemment celle des acides phénols. Comme en outre les alcaloïdes connus, chaksine et isochaksine ont des propriétés analgésiques, on comprend que les préparations de ces graines soient employées en médecine populaire.

A notre avis, c'est un extrait aqueux total qui doit faire l'objet d'études pharmacologiques poussées, après mise sous une forme galénique adéquate.

- ETUDE TECHNOLOGIQUE -

Introduction

1. Broyage et séparation
2. Extraction
3. Dessiccation
4. Mesures physico-chimiques

Conclusion

INTRODUCTION.-

Il peut paraître étonnant dans un travail de Pharmacognosie d'inclure une partie consacrée à la technologie d'un constituant particulier. Mais de nombreuses plantes, après avoir été étudiées au laboratoire, ont un devenir industriel.

Nous avons vu précédemment l'existence dans ces graines, d'une fraction polysaccharidique importante.

Or, dernièrement, le Département de l'Agriculture des Etats Unis (1) a fait procéder à une étude exhaustive portant sur plus de 300 plantes en vue de trouver de nouvelles sources de polysaccharides.

Les Légumineuses étaient représentées dans cette étude par 45 genres et 73 espèces dont plusieurs Cassia (mais non Cassia absus).

Les polysaccharides naturels connaissent une importance croissante dûe à leur facilité d'utilisation et à leur non toxicité.

Leurs emplois sont de plus en plus nombreux dans l'industrie :

- alimentaire (2) : comme gélifiant et épaississant dans les sauces et salades.
- papetière (3), (4) : comme liant et durcissant.
- cosmétique (5) et pharmaceutique (6) (7) : comme émulsifiant et liant.

(1) TOOKEY (H.L.), QUENTIN-JONES, Econ. Botany, 1965, 19, (2), 165-74.
(2) GLICKSMAN (M.) Adv. in Food Res. 1962, 11, 109-200.
(3) Brevet U.K., 1.084.454, 20.9.67 in Chem. Abst. 67, 101220 k.
(4) TOOKEY (H.L.), CLARK (T.F.) Tappi 1965, 48, (11), 1625-26.
(5) COOK (M.), PETERSON (H.) Drug and Cosmetic Indust. 1958, 82, 446.
(6) PATEL Indian J. Pharm. 1965, 27, 76-80.
(7) ARAUJO (O.E.), J. Pharm. Sci. 1967, 56, (9), 1141-5.

Il nous a paru intéressant de poser les bases d'une éventuelle utilisation industrielle du mucilage de Cassia absus.

Nous allons voir successivement les problèmes posés par le broyage, l'extraction et la dessiccation et leur transposition sur le plan industriel. Ensuite, nous parlerons de l'influence de la dessiccation sur les propriétés physiques du mucilage en particulier, le pouvoir de gonflement et la viscosité.

1. Broyage et séparation.-

La graine comporte plusieurs parties, le mucilage étant localisé dans la partie externe. Il importait donc de séparer l'amande dépourvue de mucilage des téguments et tissus sous-jacents. Nous disposions au laboratoire, d'un broyeur à couteaux HENRY muni de deux grilles, l'une de 5,5 mm, l'autre de 3,5 mm.

Après trois passages à la grille de 5,5 mm, avec un écartement des couteaux de 7,5 mm, les graines sont passées sur tamis module 32. La partie retenue par le tamis contient les pellicules mucilagineuses presque totalement dépourvues d'amandes. Néanmoins, un triage manuel ultérieur permet de terminer la séparation.

Le rendement est de 40 % de téguments alors qu'un essai sur 10 g de graines broyées et séparées à la main donne 55 %. Il y a donc une perte de 15 % au broyage.

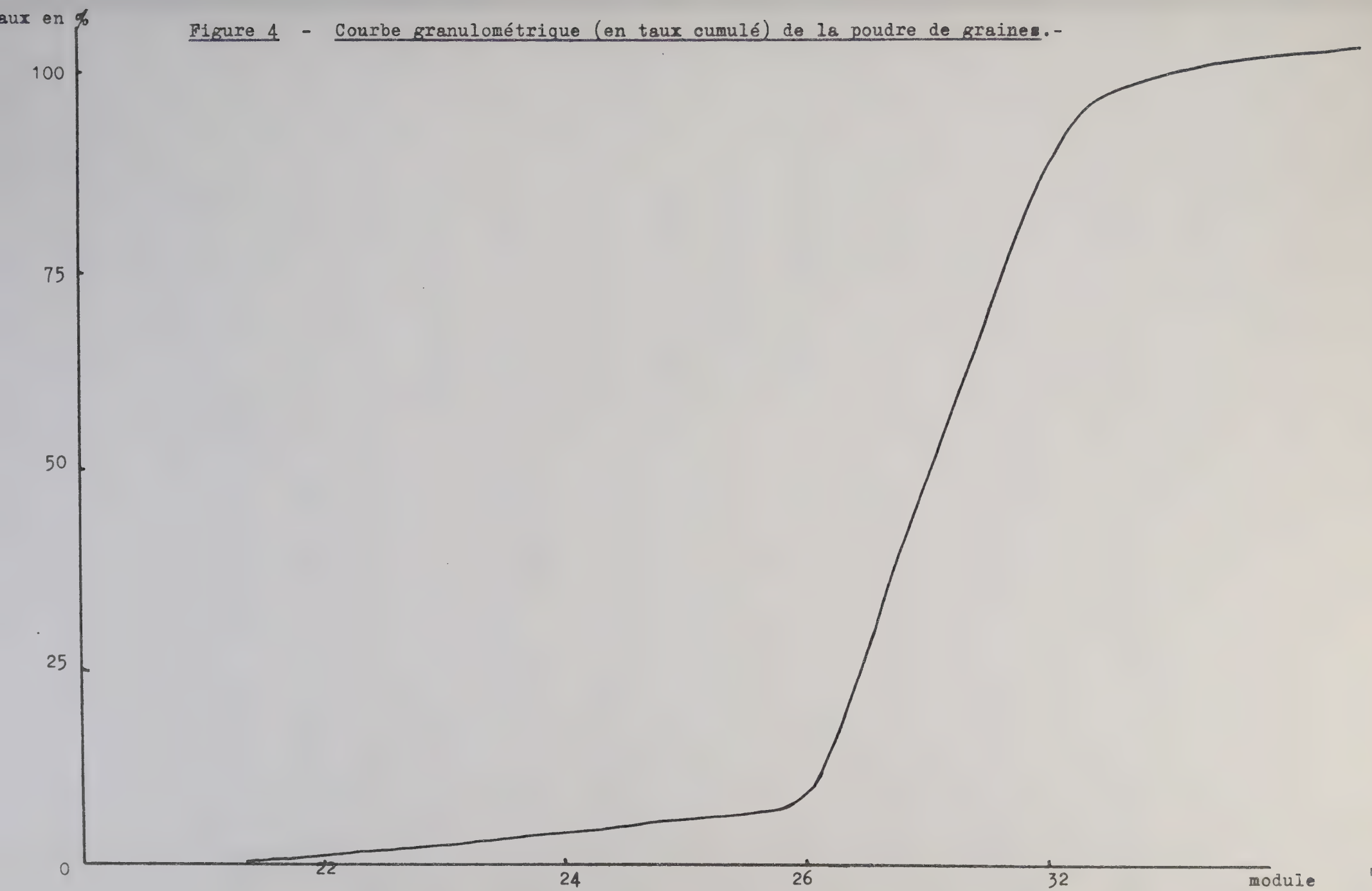
Solution technique proposée : Broyage dans un moulin type moulin à blé.

Ce procédé est employé pour l'extraction de mucilages de graines de Légumineuses (1).
La séparation se fait par différence de densité des particules au moyen d'un courant d'air.
L'enveloppe contenant le mucilage est ensuite réduite en farine, rendant ainsi l'extraction plus aisée.

En vue de faciliter l'extraction par un bon contact des graines et du solvant, il faut obtenir une poudre à granulométrie uniforme et comprise entre les modules 26 et 32.

(1) TOOKEY (H.L.), PFEIFFER (V.F.), MARTIN (C.R.), J. Agr. Food Chem. 1963, 11, (4), 317-21.

Figure 4 - Courbe granulométrique (en taux cumulé) de la poudre de graines.-



2. Extraction.-

Les mucilages sont des substances hydrosolubles, et ce sera toujours une extraction aqueuse qui sera réalisée.
Les paramètres sont :

a. la température d'extraction
b. le temps de contact
c. le volume d'eau à employer.

Le principal problème est l'appareillage. Il n'a pas été résolu au laboratoire, mais des solutions peuvent être proposées.

Etude des paramètres :

a. la température :

On peut envisager :

- l'extraction à 100°C, mais elle nécessite un appareillage spécial, la masse devenant vite importante étant donné le gonflement des cellules à mucilage.
- à 60°C, en enceinte thermostatée. Le temps de contact est plus long et le rendement inférieur au précédent.

b. le temps de contact :

C'est un paramètre difficile à déterminer en théorie, car la plupart des indications que nous avons pu recueillir provenaient d'études chimiques ne se préoccupant pas de rendement au sens industriel.
Il est en effet raisonnable de penser qu'en allongeant le temps de contact entre le solvant et la drogue, on parviendra à épuiser celle-ci. Nous avons, après essais, fixé le temps à 4 heures pour l'extraction à 100°C, et à 6-8 heures pour celle à 60°C.

Il est d'ailleurs plus profitable de réitérer deux fois l'extraction avec un nouvel apport d'eau que de prolonger le temps de la première opération.

c. le volume de solvant :

Nous avons suivi la méthode employée par POURRAT (1) pour l'extraction du galactomannane des graines de Gleditschia triacanthos. Le volume d'eau est de 50 à 60 fois le poids de graines à traiter. C'est donc là que se situe le point critique. En effet, pour une quantité de 100 kgs de graines, il faut déjà de 5 à 6000 litres d'eau.

Nous étions limités, au laboratoire à un récipient d'une contenance de 20 litres, soit le volume nécessaire au traitement de 400 grammes de graines.

Une fois la solution mucilagineuse obtenue par l'une ou l'autre des méthodes citées plus haut, il faut pratiquer une filtration puis une concentration nécessaire pour réduire le volume trop important.

La filtration peut se faire à l'aide d'un filtre multiplateaux maintenu sous pression.
Pour éviter un colmatage trop rapide, une clarification est recommandée de même que l'emploi d'adjuvants de filtration facilitera cette préfiltration.

L'obtention du mucilage brut se fait par précipitation à l'alcool absolu (2) ou par nébulisation (3). La séparation du mucilage précipité peut se faire à l'aide du clarificateur centrifuge type WESTFALIA.

(1) POURRAT (H.), POUGET (Mme A.), POURRAT (Mme A.), Ann. Pharm. Fr. 1966, 24, (1), 69-72.

(2) WHISTLER (R.L.) Methods in Carbohydrate Chemistry. Academic Press Ed. New-York, 1965, 5, 56.

(3) MAUVERNAY (R.Y.) B.S.M. n° 1216 M du 29 Mars 1961.

3. Dessiccation.-

Nous allons voir maintenant l'influence de ces différents modes de séchage sur la conservation et les propriétés physiques du mucilage. Le choix du mode de dessiccation doit être guidé tout d'abord par la finalité de l'emploi, la qualité du mucilage est différente selon le procédé choisi.
Les considérations économiques ne sont pas non plus négligeables. L'alcool est un produit qui coûte cher mais peut être recyclé. La nébulisation nécessite elle, un investissement important et de grosses dépenses d'énergie.

a) - Précipitation à l'alcool et dessiccation :

La précipitation se fait en versant la solution mucilagineuse dans l'alcool absolu maintenu en constante agitation.
L'expérience nous a prouvé que le mucilage en solution aqueuse diluée pouvait être sensible aux contaminations.

Il importe donc de sécher le mucilage aussitôt après sa préparation. Néanmoins, on peut, pour certains emplois, préparer la solution mucilagineuse avec des conservateurs autorisés tels les parahydroxybenzoates de méthyle et de propyle.

Nous avons observé que le mucilage non séché était sensible à la chaleur (80°C), à l'air et à la lumière. Après différents essais, nous avons obtenu une poudre chamois clair par séchage sous vide à une température inférieure à 60°C.

On peut éviter la précipitation à l'alcool en pratiquant dès après filtration un séchage sous vide.

b) - atomisation :

Elle consiste à séparer finement le liquide à sécher dans l'air chaud Le meilleur rendement sera obtenu lorsque le Δt (différence entre les températures d'entrée et de sortie) est maximal (1) tout en gardant la température de sortie la plus basse possible.
Lorsqu'il s'agit de nébulisation d'un extrait végétal, il n'y a pas de règle générale (2), et il faut opérer par tatonnements en jouant sur les différents paramètres :

- paramètres liés à la solution de mucilage :
  - . viscosité
  - . densité
  - . tension superficielle
  - . température maximale supportée par la substance

- paramètres liés à l'appareil :
  - . préchauffage
  - . débit de l'alimentation
  - . vitesse de rotation de la turbine
  - . température d'entrée et de sortie et Δt.

Les températures les plus utilisées dans l'atomisation d'extraits végétaux sont comprises entre 130 et 170°C pour la température d'entrée et 70°C et 85°C pour la température de sortie (3). Il est nécessaire d'opérer avec des températures bien définies et stabilisées. Si la température d'entrée subit de trop fortes hausses, le produit risque de se dégrader bien que le temps de contact soit très court.

(1) SWINNEN (R.) Labo Pharma Prob. Tech. 1966, 143, (4).
(2) VERDERIO (E.), Il Farmaco, Ed. Prat. 1964, 19, (7)
(3) NEWTON, in Intern. Pharm. Abst. 1966, 3, (17), 1191.

Nous pouvons fixer les conditions de l'atomisation de la manière suivante :

- vitesse de la turbine : 10.000 t/minute
- température d'entrée : 155°C-165°C
- température de sortie : 85°C
- Taux d'humidité résiduel : Il est inversement proportionnel à Δ t.

Dans les conditions énoncées ci-dessus, il est de 2,2 %.

4. Mesures physico-chimiques :

- pH de la solution aqueuse

le pH d'une solution à 1 % est de 6,5 donc très près de la neutralité (gomme arabique : 5,5 ; gomme adragante : 5).

- Indice de gonflement

Exprimé en nombre de ml, c'est le volume occupé par la drogue et le mucilage qui y adhère lorsque 1 g de substance est mis en présence de 25 ml d'eau dans les conditions indiquées par la Pharmacopée française (1).

- Viscosité

Cette mesure fait l'objet de nombreuses discussions et peut être faite différemment.

La rhéologie ou science des écoulements met en jeu un certain nombre de propriétés physiques des fluides et notamment leur viscosité. Elle est l'étude générale des relations entre les contraintes et les déformations des corps.

(1) Pharmacopée française 8è éd. Paris, 1965.

La loi de NEWTON permet de définir le rapport qui lie la force de cisaillement, exprimée en dynes/ cm2, à la vitesse de cisaillement en cm/s.

Il est égal à : $\eta = \frac{\tau}{D}$

τ = force de cisaillement

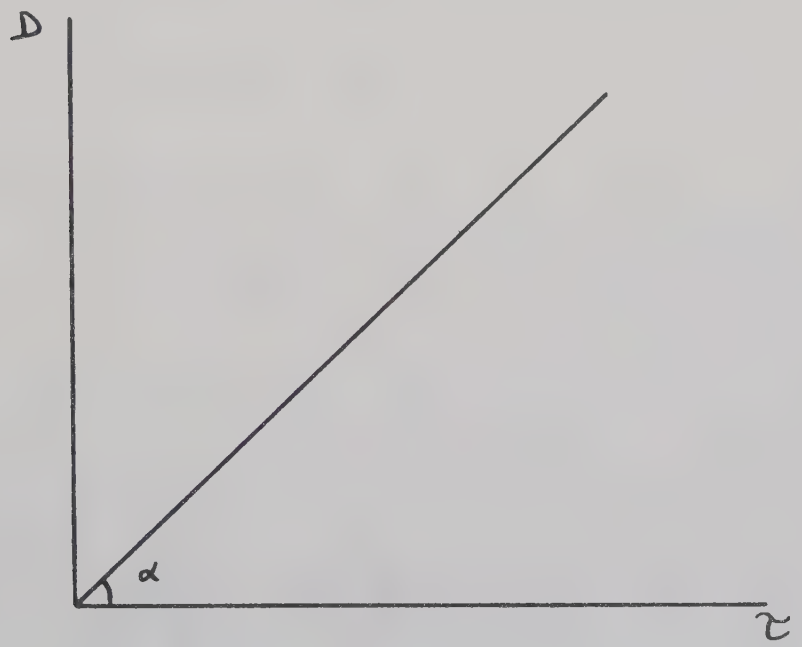
D = vitesse de cisaillement

η est la viscosité dynamique exprimée en Poise.

Un fluide a une viscosité d'une Poise, si la tension de cisaillement de 1 dyne/cm2 donne une vitesse de cisaillement de 1 cm/s.

La viscosité cinématique est le rapport de la viscosité dynamique à la masse volumique du fluide considéré. Elle s'exprime en Stokes.

La proportionnalité entre la vitesse de cisaillement et la force de cisaillement définit les fluides newtoniens (courbe ci-dessous)

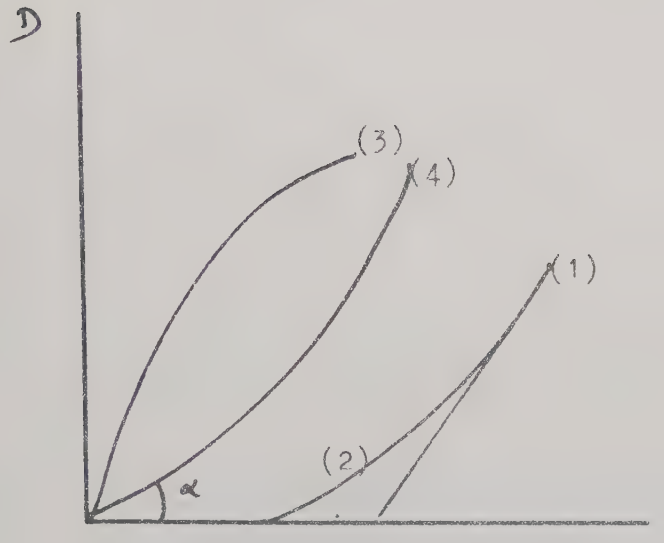


$\eta = \frac{\tau}{D} = \text{ctg}\ \alpha$

- Exemples de liquides newtoniens :
  eau, lubrifiants liquides à basse viscosité à structure chimique en chaine longue non ramifiée.

Les fluides non newtoniens sont tels qu'il n'y a pas proportionnalité entre vitesse et force de cisaillement (1).

Nous représenterons sur un graphique les différents types de fluides non newtoniens.



(1) Plastique idéal (C. BINGHAM)
ex : silicates

(2) Plastique non idéal (C. CASSON)

(3) Corps dilatant
ex : amidon dans l'eau

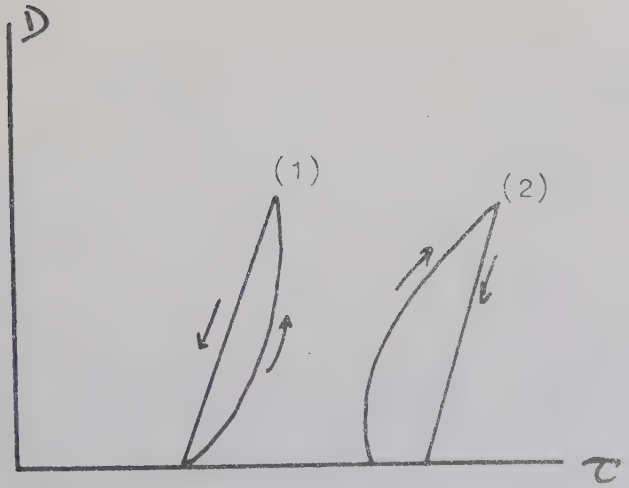
(4) Corps pseudoplastique
ex : polyoléfine, gommes naturelles.

A ce comportement peuvent se surajouter deux phénomènes, caractérisés par le fait que la courbe $\tau = f(D)$ présente une boucle d'hystérésis lors de la décroissance de la vitesse de cisaillement.

Nous distinguerons :

. la thixotropie (1) : émulsion aqueuse de cire de carnauba, miel.

. la rhéopexie (2) : jaune de chrome dans l'huile de lin.



(1) VAN WAZER (J.R.), Viscosity and Flow measurement, Interscience Publ. New-York, 1963.

Les méthodes qui permettent de mesurer la viscosité, sont en partie liées à la nature du produit visqueux :

1 - Viscosimètres de mesure des liquides newtoniens
- . coupes AFNOR
- . viscosimètre capillaire (OSTWALD)
- . viscosimètre à chute de billes

2.- Liquides non newtoniens
- . cylindres coaxiaux
- . système cône-plaque.

Nous nous adresserons successivement à ces deux types de déterminations dont le choix sera fait en fonction du paramètre étudié.

Les polysaccharides végétaux en solution sont des fluides non newtoniens. Il faut considérer le comportement rhéologique plus que la viscosité qui est une grandeur relative, c'est le rhéogramme, courbe de la force de cisaillement (τ) en fonction de la vitesse de cisaillement (D) qui défini la nature visqueuse du fluide considéré.

Nous avons utilisé pour ces mesures un rhéomètre à cylindres coaxiaux (Rhéomat).

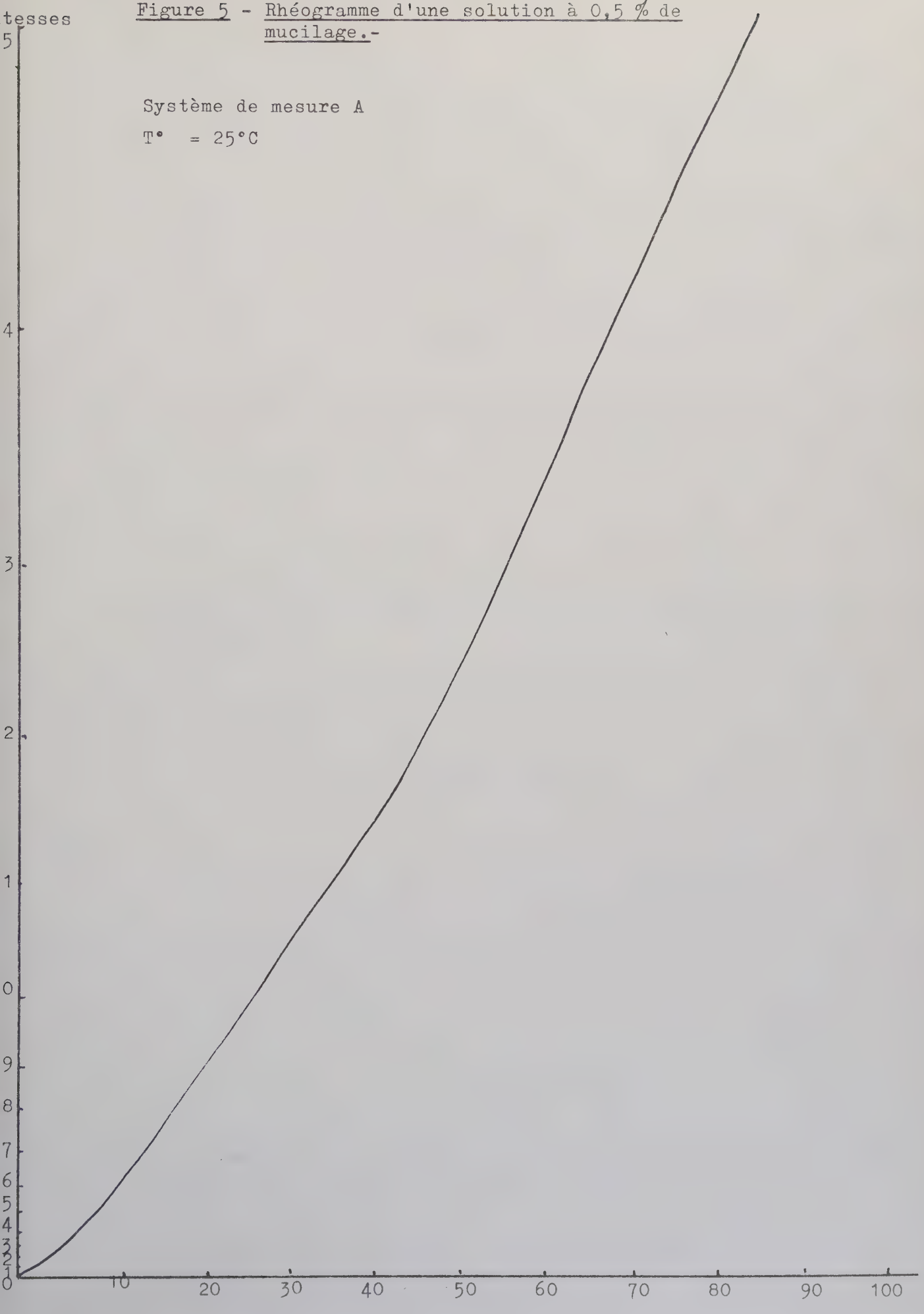
La figure 5 représente le rhéogramme d'une solution à 0,5 % de mucilage. Il est caractéristique d'un corps pseudoplastique (1).

(1) HEDIGER (M.) Mesures de caractéristiques rhéologiques CONTRAVES AG. Zurich, 1970.

Figure 5 - Rhéogramme d'une solution à 0,5 % de mucilage.-

Système de mesure A

T° = 25°C



Les variations de la viscosité en fonction des conditions de séchage du mucilage, de sa concentration dans l'eau ont été appréciées par des mesures effectuées avec le viscosimètre à capillaire d'OSTWALD.

1/ - Influence du mode de séchage de la matière première sur la viscosité d'une solution à 1 % de mucilage (p/v), à 2,5 % d'humidité résiduelle.

TABLEAU XVII

Mode de séchage	Viscosité (en centimètres) à 25°C
Dessiccateur à la lumière	68
Etuve à 70°C	71
Dessiccateur à l'obscurité	73
Dessiccateur à l'étuve à vide	190
Nébulisation	45

2/ - Influence de la concentration sur la viscosité

TABLEAU XVIII

Concentration	Viscosité (en centi-poises) à 25°C
1 %	68
0,5 %	25
0,25 %	2

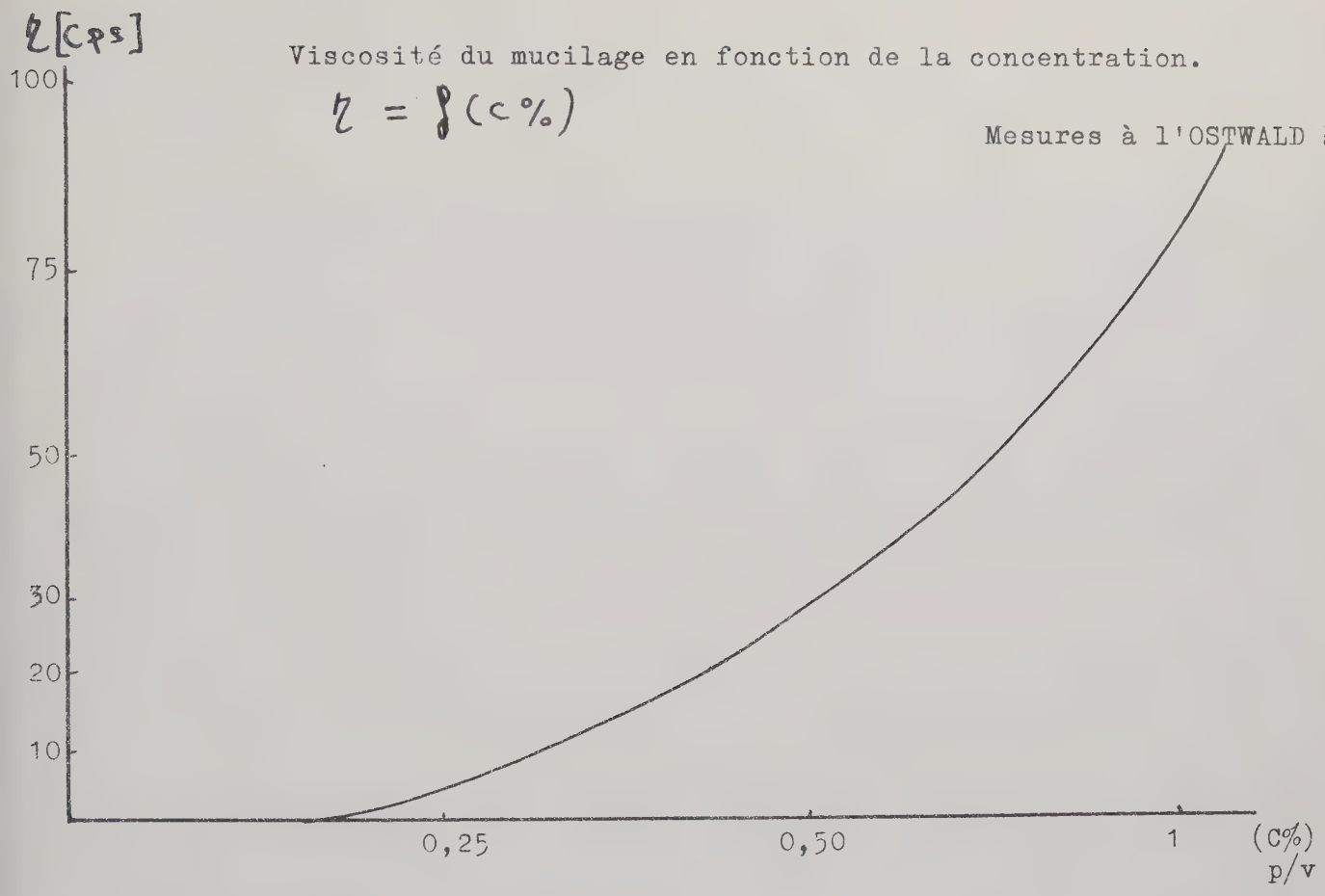
3/ - Influence de la température sur la viscosité

L'augmentation de température diminue la viscosité mais celle-ci retrouve sa valeur par refroidissement.

Viscosité du mucilage en fonction de la concentration.

$\eta = f(c\%)$

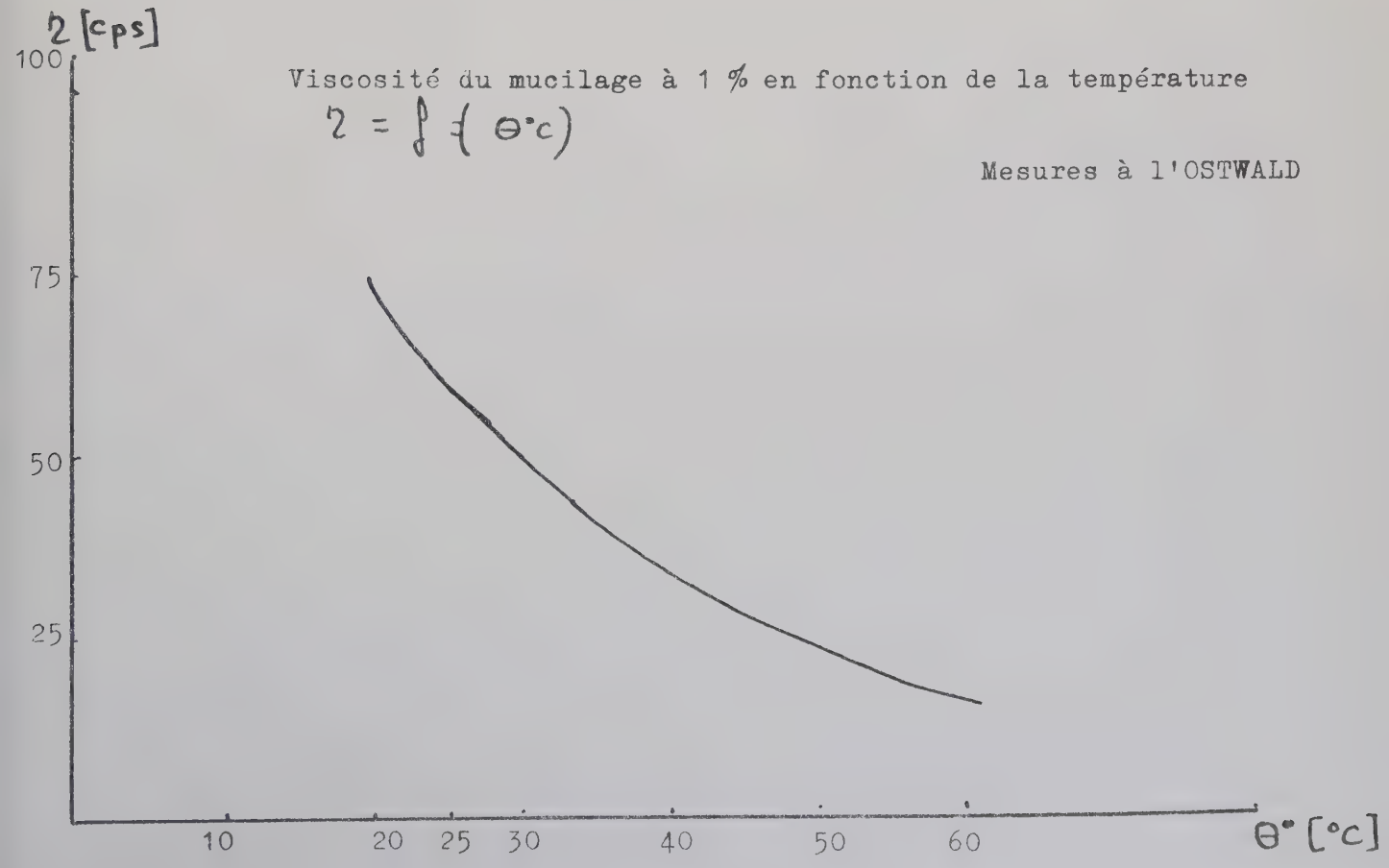
Mesures à l'OSTWALD à 25°C



Viscosité du mucilage à 1 % en fonction de la température

$\eta = f(\theta°c)$

Mesures à l'OSTWALD



CONCLUSION

Cette étude nous a permis d'évoquer les problèmes posés par l'emploi industriel d'une matière première végétale. A ces questions techniques s'ajoutent les problèmes d'approvisionnement et de prix de revient compétitif.

L'étude physico-chimique du mucilage doit être poursuivie afin de mieux connaître ses caractères. Il pourra alors trouver place parmi les autres polysaccharides naturels déjà exploités, son étude pharmacologique est en cours.

CONCLUSIONS GENERALES.-

L'échantillon étudié est très riche dans de nombreux domaines :

. polyphénols jusqu'à présent non étudiés
. alcaloïdes en partie connus
. stéroïdes, caroténoïdes, polysaccharides et protéines.

Nous avons fait un travail de prospection dans ces différents domaines. Nous avons apporté l'identification de sept acides phénols :

. férulique, sinapique, vanillique, para-coumarique, salicylique, protocatéchique, parahydroxybenzoïque.

. trois stérols : β-sitostérol, stigmastérol et cholestérol,
. un galactomannane à partie uronique.

Nous pensons que les corps nouveaux dont nous avons commencé l'étude, mais qui n'ont pas été définis, feront avec succès l'objet de recherches ultérieures :

. un alcaloïde nommé par nous "abnaline"
. deux C-glycosides de flavones et certainement d'autres flanonoïdes
. des caroténoïdes.

Nous avons constaté certaines différences avec la variété indienne, seule étudiée jusqu'ici. Il serait intéressant, surtout du point de vue chimiotaxonomique, de faire une étude comparative de ces deux variétés de provenance géographique différente.

Ce travail nous a fait prendre conscience, de l'importance de l'ethnobotanique sur le plan thérapeutique et de la richesse de la nature qui recèle encore bien des principes actifs. Seuls les efforts conjugués des chercheurs permettront de les découvrir.

Le Directeur du Laboratoire
Président du Jury

A.M. DEBELMAS

Le Président de l'Université

M. SOUTIF

Vu et permis d'imprimer

BIBLIOGRAPHIE

cités p.

11 AHMAD (Z.), Oël von Cassia absus, Z. Undersuch Lebensm. 1936, 70, 166-9.

14 ANTON (R.), Contribution à l'étude chimique qualitative de quelques espèces du genre Cassia L., Thès. Doct. Pharm. Strasbourg, 1967.

10 ANTON (R.) et DUQUENOIS (P.), Utilisation de la chromatographie en couches minces pour la caractérisation des dérivés anthracéniques dans les espèces du genre Cassia L. et leur identification, Ann. Pharm. Fr. 1967, 10, 589-99.

11 ANTON (R.) et DUQUENOIS (P.), Sur quelques constituants anthraquinoniques et flavoniques de C. marylandica, C.R. Acad. Sc. Paris, 1968, 266, (14), 1523-5.

84 ANTONIO (A.), DEVYS (M.), PINTE (F.) et BARBIER (M.), Sur les stérols et alcools triterpéniques tétracycliques de la fougère - Polypodium vulgare L., C.R. Acad. Sc. Paris, 1970, 271, 862-5.

100 ARAUJO (O.E.), Emulsifiyng properties of a new polysaccharide gum, J. Pharm. Sci., 1967, 56, (9), 1141-5.

96 ARPIN (N.), Les caroténoïdes des Discomycètes. Essai chimiotaxonomique Thès. Sci. Lyon 1968, n° 527.

96 ARPIN (N.), FIASSON (J.L.), LEBRETON (Ph.), Méthodes modernes d'analys des caroténoïdes, Bull. Soc. Nat. Arch. Ain, 1968, 82, 47.

6 AUBLET (E.), Histoire des Plantes de la Guyane Française, Paris, 1775, 1, 381.

51 BARTON (G.M.), EVANS (R.S.) et GARDNER (J.A.F.) Nature, 1952, 170, 249.

5 BENTHAM (G.), Revision of the Genus Cassia, Transactions of the Linnean Society, London, 1871, 27, 503-591.

6 BERHAUT (J.), Flore du Sénégal, Dakar, 1967, 51.

30 BEZANGER-BEAUQUESNE (L.), Etude des substances polyuroniques dans le but d'une amélioration de diverses monographies. Contrat de Recherches Adrapharm n° 54, 1969.

21 BROCQ ROUSSEU et FABRE (R.), Les Toxalbumines, Paris, 1942.

2 CAIMENT LE BLOND (J.), Contribution à l'étude des plantes médicinales d'A.O.F. et d'A.E.F., Thèse Fac. Pharm. Paris, 1957, 39.

11 CHAKRAVARTI (R.N.) and all. Sterols from Indian beans, Indian J. Sci. Indust. Res. 1956, 150, 86-8.

cités p.

13 CHEEMA (M.A.), Pharmacological investigations of isochaksine, an alkaloïd isolated from the seeds of Cassia absus L., Intern. Arch. Pharmacodynamy, 1965, 158, (2), 307-13.

59 CHOPIN (J.) in WAGNER (H.), HORHAMMER (L.), Pharmacognosy and Phytochemistry, 1971, 117- 28.

13 CHOPRA (R.N.), Indigenous Drugs of India, Bombay, 1958.

90 CONREUR (Ch.), Alcaloïdes, stéroïdes et triterpènes tétracycliques des graines d'Hollarhena floribunda Durr et Schinz et de Funtunia latifolia Stapf, Thèse Univ. Paris XI, Fac. Sci. Orsay 1971.

100 COOK (M.), PETERSON (H.), Drug and Cosmetic Indust. 1958, 82, 446.

21 COULET (M.), BEZOU (M.J.), COGNET (B.) Bull. Soc. Chim. Biol. 1959, 41, 1835-89.

22 COULET (M.), CLUZEL (R.) et BEZOU (M.J.), Procédé de purification de l'hémagglutinine de Phaseolus vulgaris L., Lyon Pharmaceutique 1966, n° spécial 119-122.

49 COURBET (H.), METCHE (M.), Extraction et identification des acides phénols des spores d'Osmunda regalis L., C.R. Acad. Sc. Paris, 1971, 272D, (12), 1086-89.

11-14 CUBUKCU (B.), Recherches sur quelques Cassia africains et en particulier sur le Cassia goratensis Fres., Th. Doct. Pharm. Paris, 1962.

75 CUBUKCU (B.), Les alcaloïdes quaternaires de Berberis crataegina D.C. et de B. cretica L., Pl. Med. et Phytothérapie, 1968, 2, (4), 272-80.

20 DEBELMAS (A.M.), FAURE (M.) et TRAJMAN (G.), Etude de deux fractions intéressantes de Cassia absus L., Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon, 1969, 13, (4), 115-18.

3 DE WILDEMAN (E.), A propos de médicaments antilépreux d'origine végétale, Inst. Royal col. Belge, t.X., Bruxelles 1948, 17.

31-41 DISCHE (Z.), The reaction of carbazole with Carbohydrates, J. Biol. Chem. 1947, 171, 189.

41 DISCHE (Z.) and ROTHSCHILD (C.), Two modifications of the carbazole reaction of hexuronic acides, Analytical Biochemistry 1967, 21, (1), 125-130.

2 DYMOCK (W.), Vegetable Materia Medica of West India, Bombay, 1885, 267.

46-60 EGGER (K.) Die Analyse des Flavonersindungen, Planta Medica, 1964, 3, 265-71.

cités p.

84 EL IDRISSI (T.), Etude d'une Asclépiadacée marocaine : Pergularia tomentosa, Thès. Doct. Univ. Pharm. Grenoble, 1971, 27.

5 ENGLER (A.) und PRANTL (K.), Die Naturlichen Pflanzen Familien, Leipzig 1894, III, (3), 157.

2-3 ETESSAMI (S.), Contribution à l'étude de la Matière Médicale d'Iran Thèse Fac. Pharm. Paris, 1949, 53-54.

10 FAIRBAIRN (J.W.), FRIEDMANN (C.A.) et RYAN (M.A.), A new active glycoside of Senna, J. Pharm. Pharmacol. 1958, 10, 186-191.

96 FIASSON (J.L.), Les caroténoïdes des Basidiomycètes, Thès. Sci. Lyon, 1968, n° 362.

12 FOWLER (L.R.), VALENTA (Z.) and WIESNER (K.), Structure of Chaksine, Chem. and Indust. 1962, 1, 95.

41 GALAMBOS (J.T.) and MacCain (J.R.), The reaction of carbazole with carbohydrates - Effect of borate and sulfamate on the U.V. absorption of sugars, Analytical Biochemistry, 1967, 19, 119-132.

100 GLICKSMAN (M.), Utilization of natural polysaccharide gums in the Food industry, Adv. in Food Res. 1962, 11, 109-200.

96 GODWIN (T.W.), Caroténoïds, in PAECH (K.) and TRACEY (M.V.), Modern methods of Plant analysis, Berlin, Springer Verlag, 1955, 3, 272-312.

31-41 GREGORY (J.D.), A modification for the reaction of carbazole with carbohydrates, Arch. Bioch. Biophys. 1960, 89, 157.

13 GUHA (S.R.), Pharmacology of Chaksine, Science and Culture, 1958, 24, 146.

35 HAALAND (E.), Water-soluble Polysaccharides from the leaves of Tussilago farfara L., Acta Chem. Scand. 1969, 23, (7), 2546-8.

13 HAQUE (M.), Pharmacology of chaksine, Thesis, Pandjab University, Lahore 1945.

69-73 HARBORNE (J.B.), BOULTER (D.), and TURNER (B.L.), Chemotaxonomy of the Leguminosae, Academic Press London and New-York, 1971.

111 HEDIGER (M.), Mesures de caractéristiques rhéologiques, CONTRAVES AG. Zurich, 1970.

49 IBRAHIM (R.K.), TOWERS (G.H.N.) in RIBEREAU-GAYON (P.), Les composés phénoliques des végétaux, Paris, Dunod éd. 1968.

12 JOHNSON (A.W.)
J. Org. Chem. 1958, 23, 1814-5.

cités p.

11 JOSHI (J.B.), VARMA (K.C.)
Indian J. Pharm. 1964, 26, 175-7.

40 KAPOOR (V.P.), MUKERJEE (S.), Nature of sugars in Cassia absus L. seeds polysaccharide, Current Sci. India 1969, 38 (2), 38-39.

40 KAPOOR (V.P.), MUKERJEE (S.), Isolation of five oligo-saccharides in the galactomannane of Cassia absus L. seed, Phytochemistry 1971, 10, (3), 655-9.

12 KAPUR (H.R.), GAIND (K.N.), NARANG (K.S.), RAY (J.N.), A new formula for Chaksine, the alkaloïd of C. absus, J. Ind. Chem. Soc. 1940, 17, 281-4.

2-3 KERHARO (J.), Les Cassia dans la Pharmacopée Sénégalaise, Bull. Soc. Med. Afr. Noire Lgue Fr. 1969, XIV, (1), 1-19.

2 KERHARO (J.), Revue des plantes médicinales et toxiques du Sénégal, Pl. Med. et Phytothérapie. 1968, 2 (2), 108-46.

2 KERHARO (J.) et BOUQUET (A.) Plantes médicinales et toxiques de la Côte d'Ivoire, Haute Volta, Paris, Vigot Fr., 1950, 103.

12 KERMAL (A.), HAHN (G.),
J. Chem. Soc. 1958, 555.

22 KERMAL (A.) et NAZAR (M.), Paper chromatography of free and bound amino-acides in Cassia absus L. seed, Pakist. J. Sci. Res. 1967, 19 (1), 4-6.

13 KHAN (I.), BUKHARI (A.Q.S.), KHAN (M.H.), Pharmacological action of Chaksine and Isochaksine, Pakist. J. Sci. Indust. Res. 1963, 6, 97

11 KOBERT (R.), Lehrbuch der Intoxicationem, Stuttgart, 1906, 707.

21 KUNITZ (M.), MACDONALD (M.R.), Isolation of cristalline ricin, J. Gen. Physiol. 1948, 32, 25.

46 LEBRETON (Ph.), Introduction à l'étude des flavonoïdes du houblon Thèse Faculté des Sc. Lyon, 1960.

46 LEBRETON (Ph.), Contribution à l'étude des flavonoïdes chez Humulus Lupulus L. et autres urticales, Thèse Dr. ès Sc. Lyon, 1962, n° 291.

5 LINNE (C.), Genera Plantarum, Stockholm, 1735.

6 LINNE (C.), Species Plantarum, Stockholm, 1735, 376.

21 LUGNIER (A.) et DIRHEIMER (G.), Extraction, purification et détermination du poids moléculaire de la ricine, toxalbumine de Ricinus communis, C.R. Acad. Sc. Paris, 1971, 273D, 704-7.

cités p.

11 LYTH GOE (D.), VERNENGO (M.J.), Alkaloïds from Cassia carnaval : cassine and carnavaline, Tetrahedron Letters 1967, 12, 1133-7.

12 MANSKE (R.H.F.), The alkaloïds, Academic Press New-York, 1961.

10 MAURIN (E.), La richesse des différents Sénés en dérivés anthracéniques, Bull. Sc. Pharmacol. 1922, 29, 617-22.

106 MAUVERNAY (R.Y.), B.S.M. n° 1216 M du 29 Mars 1961.

49 MINALE (L.), PIATELLI (M.), DE STEFANO (S.), NICOLAU (R.A.), Pigments of Centrospermae, VI - Acylated betacyanins, Phytochemistry 1966, 5, 1037.

25 MISRA (D.S.), Abrus praecatorius L. - Hemagglutining and toxic properties, Indian J. of. Exp. Biol. 1966, 4, (3), 161-63.

3 NADKARNI (A.K.), Indian Materia Medica. Bombay, 1954, 282.

108 NEWTON, in Intern. Pharm. Abst. 1966, 3, (17), 1191.

13 NICKELL (L.G.)
Econ. Botany, 1959, 13, 281.

11 PANT (R.), SINGH (K.S.), Albumins and globulins of some leguminous seeds, Naturwissenschaften, 1969, 56, 139.

49 PARIS (R.), HERISSET (A.) et CHAUMONT (J.P.), Sur les polyphénols, flavonoïdes, acides-phénols et coumarines des capitules de l'Anthemis nobilis L., variations au cours de la floraison, C.R. Acad. Sci. Paris, 1968, 267D, 740-2.

49 PARIS (R.) et MURGU (Mme M.), Les composés polyphénoliques de Spiraea crenata. I - Identification des acides phénols, Pl. Med. et Phytotherapie, 1970, 4, (2), 138-49.

100 PATEL, Ghatti gum as a binding agent in tablets, Indian J. Pharm. 1965, 27, 76-80.

23 PERCHERON (F.), PERLES (R.), guide des travaux pratiques de Biochimie Paris, 1967, 30-31.

35 PINKAS (M.), BEZANGER-BEAUQUESNE (Mme L.), TROTIN (F.), Précisions sur la composition du mucilage de Consoude, C.R. Acad. Sc. Paris, 1965, 261, 843-7.

35-105 POURRAT (H.), POUGET (Mme A.), POURRAT (Mme A.), Préparation et contrôle du galactomannane des graines de Gleditschia triacanthos, Ann. Pharm. Fr. 1966, 24 (1), 69-72.

12 PURI (V.N.), SHARMA (V.N.), SIDDIQI (S.), Studies in the alkaloïds of C. absus, Indian J. Sci. Indust. Res. 1964, 4, 701-4.

13 QAYUM (A.), Pharmacological actions of Chaksine chloride, Pakist. J. Sci. Indust. Res. 1970, 12, (4), 378-82.

cités p.

12 QURESHI (A.W.), AHSAN (A.M.), HAHN (G.), Constituents of Cassia absus - isolation and characterization of a glycoside from the seeds, Pakist. J. Sci. Indust. Res. 1964, 7, (3), 219-20.

48 RIBEREAU-GAYON (P.), Les composés phénoliques des végétaux, Paris, Dunod éd. 1968.

22 ROCHAT (J.), Les Phytohémagglutinines, Prod. et Probl. Pharm. 1970, 25 (3), 180-185.

25 SAINT PAUL (M.), Les hémagglutinines végétales, Transfusion, 1961, 4, 36-37.

11 SHUKLE (Y.N.)
J. Ind. Chem. Soc. 1968, 45, (8), 744.

12 SIDDIQI (S.), AHMAD (Z.), Alkaloïds from seeds of Cassia absus L. Proc. Indian Acad. Sci. 1935, 2A, 421-5.

12 SING (G.), NAIR (G.V.), AGGARWAL (K.P.), SAKSENA (S.S.), Structure of Chaksine, Indian J. Sci. Indust. Res. 1958, 17B, 322-3.

35 SINHA (M.P.), TIWARI (R.D.), The structure of a galactomannan from the seeds of Desmodium pulchellum, Phytochemistry 1970, 9, 1881-3

35 SMITH (F.) and MONTGOMERY (R.), The chemistry of Plant gums and mucilages New-York, Reinhold publishing company, 1959, 337.

37-74 STAHL (E.), Thin Layer Chromatography, Academic Press Inc. Ed. New-York, London, 1965.

10 STOLL (A.), BECKER (B.) et KUSSMAUL (W.), Die Isolierung der Anthraglykoside aus Sennadrogen, Helv. Chim. Acta, 1949, 32, 1892-93.

51 SWAIN (T.), The identification of coumarins and related compounds by filter paper chromatography, Biochem. J. 1952, 53, (2), 200-8.

107 SWINNEN (R.), Le séchage par pulvérisation, Labo. Pharma., Prob. Tech. 1966, 143, (4).

74 TEICHERT (K.)
Deutsch. Apotheker Ztg, 1960, 100, 477.

100 TOOKEY (H.L.), QUENTIN-JONES, New sources of water-soluble seed gums, Econ. Botany, 1965, 19, (2), 165-74.

100 TOOKEY (H.L.), CLARK (T.F.), Evaluation of seed galactomannans from Cassia species as paper additives, Tappi 1965, 48, (11), 1625-26.

102 TOOKEY (H.L.), PFEIFFER (V.F.), MARTIN (C.R.), Gums separated from Crotalaria intermedia and other leguminous seeds by dry milling, J. Agr. Food. Chem. 1963, 11, (4), 317-21.

cités p.

11 TUTIN (F.), The constituents of Senna leaves, J. Chem. Soc. 1913, 103, 2006-23.

35 UNRAU (A.M.), CHOY (Y.M.), Structure of a glactomannan from seed of Crotalaria mucronata, Canad. J. Chem. 1970, 48, 1123-8.

110 VAN WAZER (J.R.), Viscosity and Flow measurement, Interscience Publ. New-York 1963.

107 VERDERIO (E.), L'essicamento per atomizzazione, Il Farmaco Ed. Prat, 1964 19 (7).

6 VOGEL (Th.), Generis Cassiae Synopsis, Berlin, 1837, 50.

74 WALDI (D.), SCHNAKERZ (K.), MUNTER (F.), Eine Systematische Analyse von Alkaloiden, J. Chromatography 1961, 6, 61.

33 -106 WHISTLER (R.L.), Methods in Carbohydrate Chemistry New-York, Academic Press Inc., 1965.

12 WIESNER (K.), VALENTA (Z.), The structure of Chaksine, a monoterpene alkaloïd, J. Amer. Chem. Soc. 1958, 80, 1521-2.

TABLE DES MATIERES

page

- INTRODUCTION 1

- RAPPEL BOTANIQUE 4
  I - Généralités sur les Cassia 5
  II - Cassia absus L. - Caractères particuliers 6
  1 - Description et étude morphologique 6
  2 - Description de la graine 7

- ETUDE CHIMIQUE 9
  TRAVAUX ANTERIEURS

  I. Les Cassia 10
  II. Cassia absus 11

  TRAVAUX PERSONNELS

  I. Composition générale. Essais préliminaires 15
  II. Etude de quelques fractions 20

  A) Protéines
  1. Extraction 21
  2. Etude chimique de cette fraction 22
  3. Essais biologiques 25

  B) Polysaccharides
  1. Séparation et extraction des téguments externes 28
  2. Etude chimique 29
  3. Etude chromatographique 35

page

C) Polyphénols

1. Généralités 44
2. Extraction et fractionnement 44
3. Etude chromatographique de l'extrait éthéré 48
4. Etude chromatographique de l'extrait butanolique 59
5. Essai d'isolement des flavones 63
6. Etude spectrale en ultra-violet 67

D) Etude de la substance X 73

E) Etude de l'insaponifiable

1. Extraction 80
2. Recherche des constituants 80
3. Saponification 80
4. Chromatographie des stérols 83
5. Etude spectrale des caroténoïdes ... 96

Conclusion de l'étude chimique 98

- ETUDE TECHNOLOGIQUE

INTRODUCTION 100

1. Broyage et séparation 102
2. Extraction 104
3. Dessiccation 106
4. Mesures physico-chimiques 108

Conclusion de l'étude technologique 115

CONCLUSIONS GENERALES 116
BIBLIOGRAPHIE 117